



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 795 950**

⑮ Int. Cl.:

C07D 493/08 (2006.01)
A61K 31/34 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2016 PCT/US2016/032123**

⑰ Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2016 WO16186963**

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2016 E 16796978 (1)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 3294287**

⑮ Título: **Profármacos de oxabicitcloheptano**

⑯ Prioridad:

15.05.2015 US 201562162501 P

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2020

⑮ Titular/es:

LIXTE BIOTECHNOLOGY, INC. (100.0%)
248 Route 25A, No. 2
East Setauket, NY 11733, US

⑯ Inventor/es:

KOVACH, JOHN, S.;
VOLKMANN, ROBERT y
MARFAT, ANTHONY

⑯ Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 795 950 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Profármacos de oxabicicloheptano

- 5 La presente solicitud reivindica la prioridad respecto de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.º 62/162.501, presentada el 15 de mayo de 2015.

Antecedentes de la invención

- 10 Los retinoides, metabolitos de la vitamina A, se han examinado terapéuticamente contra una variedad de tumores, incluyendo gliomas (Yung *et al.* 1996). El correpresor del receptor nuclear (N-CoR) está estrechamente asociado con el receptor retinoide y se libera al unirse el ligando al receptor (Bastien *et al.* 2004). Al prevenirse la acción de la proteína fosfatasa-1 y la proteína fosfatasa-2A (PP2A), las antifosfatases aumentan la forma fosforilada de N-CoR y 15 potencian su posterior translocación citoplasmática (Hermanson *et al.* 2002).

- 15 El inhibidor de fosfatasa, la cantaridina, tiene actividad antitumoral contra los cánceres humanos del hígado (hepatomas) y del tracto gastrointestinal superior, pero es tóxico para el tracto urinario (Wang, 1989). La cantaridina actúa como un inhibidor de la proteína fosfatasa, lo que provocó un interés más general en los compuestos con este tipo de estructura química (Li y Casida 1992). Anteriormente, se había descubierto que el congénere más simple y su 20 producto de hidrólisis (disponible en el mercado como el herbicida Endothal) son hepatotóxicos (Graziani y Casida, 1997). Los estudios de unión han demostrado que la acción de ciertos homólogos de cantaridina es directa en la proteína fosfatasa-2A e indirecta en la proteína fosfatasa-1 (Honkanen *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1993).

- 25 De los congéneres conocidos de este tipo de compuesto, solo el precursor, la cantaridina, y su derivado de bis(normetilo), la norcantaridina, han visto algún uso como sustancias farmacológicas contra el cáncer, y solo se usa la norcantaridina como agente antineoplásico (Tsauer *et al.* 1997).

- 30 A pesar de estos éxitos, pocos han sido los compuestos de este tipo que se han seleccionado para detectar actividad antitumoral o citotóxica. En la actualidad, existe una gran necesidad de desarrollar inhibidores de las proteínas fosfatases que sean más activos, menos tóxicos y más específicos en acción que las sustancias conocidas mencionadas anteriormente. En particular, existe la necesidad de enfermedades tales como los gliomas malignos de 35 alto grado de niños y adultos.

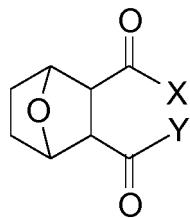
- 35 El glioma pontino intrínseco difuso (DIPG, *Diffuse Intrinsic Pontine Glioma*) es un cáncer del tronco encefálico no operable en niños para el que ningún tratamiento, aparte de la radiación, ha ofrecido una prolongación de la vida, con una supervivencia con el mejor cuidado de aproximadamente 12 meses. Los múltiples ensayos de quimioterapia adyuvante no han mejorado significativamente los resultados (Warren *et al.* 2011; Hawkins *et al.* 2011). Hay aproximadamente 300 casos nuevos diagnosticados anualmente en Estados Unidos. El glioblastoma multiforme (GBM) es un cáncer cerebral agresivo que ocurre en aproximadamente 20000 adultos al año en EE. UU. para el que 40 el tratamiento convencional (cirugía primaria, seguida de 6 semanas de radiación más temozolomida, seguida de temozolomida oral diaria) solo ha aumentado la esperanza media de vida de menos de un año a aproximadamente 18 meses a pesar de 50 años de pruebas de terapias experimentales (Stupp *et al.* 2009). Hay una necesidad urgente de nuevos tratamientos para estos gliomas.

- 45 Muchos agentes quimioterapéuticos usados para tratar el cáncer presentan toxicidad grave, produciendo efectos secundarios no deseados para los pacientes y reduciendo la eficacia al limitar las dosis que pueden administrarse de manera segura. Los profármacos, que se convierten en el fármaco activo *in vivo*, pueden ofrecer muchas ventajas frente a los fármacos precursores, tal como una mayor solubilidad, una estabilidad potenciada, una biodisponibilidad mejorada, efectos secundarios reducidos, mejor selectividad y mejor entrada del fármaco a ciertos tejidos. La 50 activación de profármacos puede implicar a muchas enzimas a través de una variedad de mecanismos, incluyendo la activación hidrolítica (Yang, Y. *et al.* 2011). Las enzimas que participan en la activación hidrolítica de los profármacos incluyen carboxilesterasas y amidasas.

- 55 Endothal es el nombre común del ácido 7-oxabiciclo[2.2.1]heptano-2,3-dicarboxílico. Es un inhibidor de PP2A, una enzima presente tanto en plantas como en animales que participa en la desfosforilación de las proteínas. El Endothal es estructuralmente similar a la cantaridina, un compuesto químico secretado por muchas especies de meloidos. El Endothal se conoce como un herbicida de contacto activo defoliante y potente que se usa en muchas situaciones agrícolas. Se considera eficaz como desecante previo a la cosecha y como herbicida selectivo previo a la emergencia. El Endothal ha sido probado contra un número limitado de estirpes celulares de cáncer humano (Thiery J. P. *et al.* 1999).

Sumario de la invención

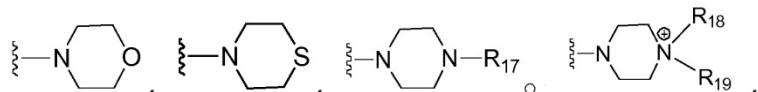
65 Se desvela un compuesto que tiene la estructura:



en donde

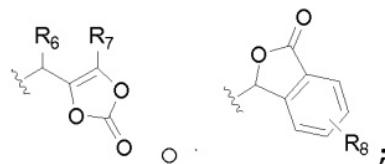
X es X es OR₁, NR₂R₃, OH, O-alquilo, O-alquenilo, O-alquinilo, O-ariilo, O-alquilarilo, O-heteroarilo,

5



en donde R₁ es H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alquilarilo, heteroarilo, alquilarilo, (alquil C₁-C₄)-O(CO)R₄, (alquil C₁-C₄)-O(CO)OR₄, O(alquil C₁-C₄)-OP(O)(OR₄)₂, (alquil C₁-C₄)-OP(O)(O(alquil C₁-C₄)-O(CO)OR₄)₂, (alquil C₁-C₄)-OP(O)(O(alquil C₁-C₄)-O(CO)R₄)₂, (alquil C₁-C₄)NR₄R₅, (alquil C₁-C₄)NC(O)R₄, (alquil C₁-C₄)C(O)OR₄, (alquil C₁-C₄)OC(O)aril(alquil C₁-C₄)P(O)(OR₄)₂, (alquil C₁-C₄)OC(O)(alquenil C₂-C₄)CO₂R₄, (alquil C₁-C₄)OC(O)(alquil C₁-C₄)NH₂, (alquil C₁-C₄)C(O)NR₄R₅,

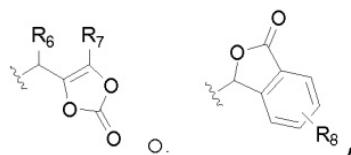
10



15

R₂ y R₃ son cada uno independientemente H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alquilarilo, heteroarilo, (alquil C₁-C₄)-O(CO)R₄, (alquil C₁-C₄)-O(CO)OR₄, O(alquil C₁-C₄)-OP(O)(OR₄)₂, (alquil C₁-C₄)-OP(O)(O(alquil C₁-C₄)-O(CO)OR₄)₂, (alquil C₁-C₄)-OP(O)(O(alquil C₁-C₄)-O(CO)R₄)₂, (alquil C₁-C₄)NR₄R₅, (alquil C₁-C₄)NC(O)R₄, (alquil C₁-C₄)C(O)OR₄, (alquil C₁-C₄)OC(O)aril(alquil C₁-C₄)P(O)(OR₄)₂, (alquil C₁-C₄)OC(O)(alquenil C₂-C₄)CO₂R₄, (alquil C₁-C₄)OC(O)(alquil C₁-C₄)NH₂, (alquil C₁-C₄)C(O)NR₄R₅,

20



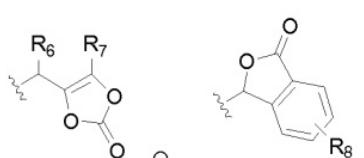
25

R₁₇ es H, alquilo, hidroxialquilo, alquenilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alquilarilo, heteroarilo, alquiheteroarilo, C(O)O-f-Bu o -CH₂CN;

R₁₈ es H o alquilo;

R₁₉ es (alquil C₁-C₄)-O(CO)R₄, (alquil C₁-C₄)-O(CO)OR₄, (alquil C₁-C₄)-OP(O)(OR₄)₂, (alquil C₁-C₄)-OP(O)(O(alquil C₁-C₄)-O(CO)OR₄)₂, (alquil C₁-C₄)-OP(O)(O(alquil C₁-C₄)-O(CO)R₄)₂, (alquil C₁-C₄)NR₄R₅, (alquil C₁-C₄)NC(O)R₄, (alquil C₁-C₄)C(O)OR₄, (alquil C₁-C₄)OC(O)aril(alquil C₁-C₄)P(O)(OR₄)₂, (alquil C₁-C₄)OC(O)(alquenil C₂-C₄)CO₂R₄, (alquil C₁-C₄)OC(O)(alquil C₁-C₄)NH₂, (alquil C₁-C₄)C(O)NR₄R₅,

30



35

en donde cada aparición de R₄ es, independientemente, H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o heteroarilo; en donde cada aparición de R₅ es, independientemente, H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o heteroarilo; en donde cada aparición de R₆ y R₇ es, independientemente, H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o heteroarilo; en donde

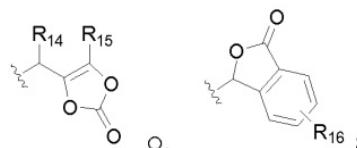
cada aparición de R_8 es, independientemente, H, halógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o heteroarilo; y

Y es OR_9 o $NR_{10}R_{11}$,

5 en donde

R_9 es H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alquilarilo, heteroarilo, alquilarilo, (alquil C_1-C_4)-O(CO) R_{12} , (alquil C_1-C_4)-O(CO) OR_{12} , (alquil C_1-C_4)-OP(O)(OR $_{12}$) $_2$, (alquil C_1-C_4)-OP(O)(O(alquil C_1-C_4)-O(CO) OR_{12}) $_2$, (alquil C_1-C_4)-OP(O)(O(alquil C_1-C_4)-O(CO) R_{12}) $_2$, (alquil C_1-C_4)-NR $_{12}R_{13}$, (alquil C_1-C_4)-NC(O) R_{12} , (alquil C_1-C_4)-C(O) OR_{12} , (alquil C_1-C_4)-OC(O)aril(alquil C_1-C_4)-P(O)(OR $_{12}$) $_2$, (alquil C_1-C_4)-OC(O)(alquenilo C_2-C_4)-CO $_2R_{12}$, (alquil C_1-C_4)-OC(O)(alquil C_1-C_4)-NH $_2$, (alquil C_1-C_4)-C(O)NR $_{12}R_{13}$,

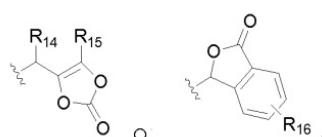
10



15 R_{10} es H; y

R_{11} es (alquil C_1-C_4)-O(CO) R_{12} , (alquil C_1-C_4)-O(CO) OR_{12} , (alquil C_1-C_4)-OP(O)(OR $_{12}$) $_2$, (alquil C_1-C_4)-OP(O)(O(alquil C_1-C_4)-O(CO) OR_{12}) $_2$, (alquil C_1-C_4)-OP(O)(O(alquil C_1-C_4)-O(CO) R_{12}) $_2$, (alquil C_1-C_4)-NR $_{12}R_{13}$, (alquil C_1-C_4)-NC(O) R_{12} , (alquil C_1-C_4)-C(O) OR_{12} , (alquil C_1-C_4)-OC(O)aril(alquil C_1-C_4)-P(O)(OR $_{12}$) $_2$, (alquil C_1-C_4)-OC(O)(alquenilo C_2-C_4)-CO $_2R_{12}$, (alquil C_1-C_4)-OC(O)(alquil C_1-C_4)-NH $_2$, (alquil C_1-C_4)-C(O)NR $_{12}R_{13}$,

20

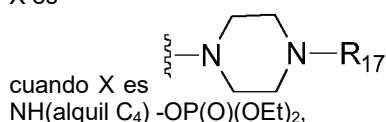
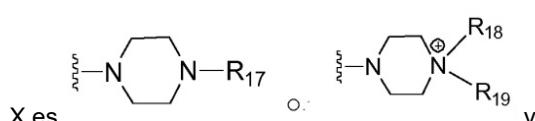


en donde cada aparición de R_{12} es, independientemente, H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o heteroarilo; en donde cada aparición de R_{13} es, independientemente, H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o heteroarilo;

25 en donde cada aparición de R_{14} y R_{15} es, independientemente, H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o heteroarilo; en donde cada aparición de R_{16} es, independientemente, H, halógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o heteroarilo,

en donde cuando Y es OR_9 , donde R_9 es H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alquilarilo, heteroarilo, alquilarilo, entonces

30

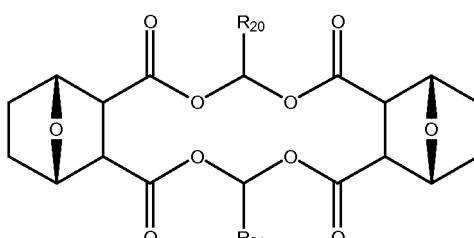


donde R_{17} es CH₃, entonces X es distinto de -O(alquil C_4)-OP(O)(OEt) $_2$ o -

NH(alquil C_4)-OP(O)(OEt) $_2$,

35 o una sal o éster del compuesto.

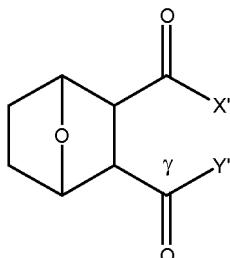
También se desvela un compuesto que tiene la estructura:



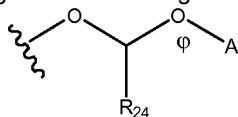
40

en donde R_{20} y R_{21} son cada uno independientemente H, alquilo, hidroxialquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alquilarilo o heteroarilo, o una sal o un éster del compuesto.

También se desvela un compuesto que tiene la estructura:



- 5 en donde
 X' es OH, O(alquilo) o NR₂₂R₂₃;
 R₂₂ es H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alquilarilo o heteroarilo;
 R₂₃ es H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, alquilarilo o heteroarilo, o R₂₂ y R₂₃ se combinan para formar una N-metilpiperazina;
- 10 Y' es un agente anticancerígeno A que contiene al menos un átomo de nitrógeno de amina, y el átomo de nitrógeno del agente anticancerígeno se une covalentemente de manera directa al átomo de carbono γ , o
 Y' es un agente anticancerígeno A que contiene al menos un átomo de oxígeno de hidroxilo, y el átomo de oxígeno del agente anticancerígeno se une covalentemente de manera directa al átomo de carbono γ , o
- 15 Y' es



- en donde A es un agente anticancerígeno que contiene al menos un ácido carboxílico y el átomo de carbono de carbonilo del ácido carboxílico del agente anticancerígeno se une covalentemente de manera directa al átomo de oxígeno ϕ , y R₂₄ es H o alquilo,
- 20 o una sal o éster del compuesto.

De acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 y 3, la presente invención se dirige a un compuesto que tiene la estructura representada en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3 o una sal del compuesto.

- 25 De acuerdo con la reivindicación 4, la presente invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende el compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 De acuerdo con la reivindicación 5, la presente invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende el compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un agente anticancerígeno, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 De acuerdo con la reivindicación 3, la presente invención también se dirige a un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3 para uso como un profármaco de Endothal.

Breve descripción de las figuras

40 Fig. 1A: Curvas de concentración frente al tiempo de 153 en plasma tras la administración IV o VO, y en hígado y cerebro tras la administración IV de 153 a ratas SD.

Fig. 1B: Curvas de concentración frente al tiempo de Endothal en plasma tras la administración IV o VO, y en hígado tras la administración IV de 153 a ratas SD.

45 Fig. 1C: Curvas de concentración frente al tiempo de 157 en plasma tras la administración IV o VO, y en hígado y cerebro tras la administración IV de 157 a ratas SD.

Fig. 1D: Curvas de concentración frente al tiempo de Endothal en plasma tras la administración IV o VO, y en hígado tras la administración IV de 157 a ratas SD.

50 Fig. 2A: Perfiles de concentración media en plasma y en hígado frente al tiempo de 105 tras la dosis IV de 1 mg/kg en ratas SD (N = 2/punto de tiempo).

Fig. 2B: Perfil de concentración media en plasma y en hígado frente al tiempo de Endothal tras la dosis IV de 105 a

1 mg/kg en ratas SD macho (N = 2/punto de tiempo).

Fig. 2C: Perfil de concentración media en plasma y en hígado frente al tiempo de 105 y Endothal tras una dosis IV de 105 a 1 mg/kg en ratas SD macho (N = 2/punto de tiempo).

Fig. 3A: Perfil de concentración media en plasma, cerebro e hígado frente al tiempo de 113 tras la dosis IV o VO de 1,4 mg/kg en ratas SD macho (N = 2/punto de tiempo).

Fig. 3B: Perfil de concentración media en plasma y en hígado frente al tiempo de Endothal tras la dosis IV de 113 a 1,4 mg/kg en ratas SD macho (N = 2/punto de tiempo).

Fig. 3C: Perfil de concentración media en plasma y en hígado frente al tiempo de 100 tras la dosis IV de 113 a 1,4 mg/kg en ratas SD macho (N = 2/punto de tiempo).

Fig. 3D: Perfil medio de concentración en plasma, cerebro e hígado de 113, 100 y Endothal tras una dosis IV o PO de 113 a 1,4 mg/kg en ratas SD macho (N = 2/punto de tiempo)

Fig. 4A: Curvas de concentración frente al tiempo de 100 en plasma tras la administración IV de 100 a ratas SD.

Fig. 4B: Curvas de concentración frente al tiempo de 100 en cerebro tras la administración IV de 100 a ratas SD.

Fig. 4C: Curvas de concentración frente al tiempo de 100 en hígado tras la administración IV de 100 a ratas SD.

Fig. 4D: Curvas de concentración frente al tiempo de Endothal en plasma tras la administración IV de 100 a ratas SD.

Fig. 4E: Curvas de concentración frente al tiempo de Endothal en hígado tras la administración IV de 100 a ratas SD.

Fig. 5: Sumario de resultados del estudio de estabilidad de S9 hepática para LB151, LB100 POM y carbonato de LB-100.

Fig. 6A: Gráfico que muestra la formación de Endothal en el estudio de S9 hepática de mono.

Fig. 6B: Gráfico que muestra la formación de Endothal en el estudio de S9 hepática de ser humano.

Fig. 6C: Gráfico que muestra la formación de Endothal en el estudio de S9 hepática de rata.

Fig. 6D: Gráfico que muestra la formación de Endothal en el estudio de S9 hepática de mono.

Fig. 6E: Gráfico que muestra la formación de Endothal en el estudio de S9 hepática de ser humano.

Fig. 6F: Gráfico que muestra la formación de Endothal en el estudio de S9 hepática de rata.

Fig. 6G: Gráfico que muestra la formación de LB100 en el estudio de S9 hepática de mono.

Fig. 6H: Gráfico que muestra la formación de LB100 en el estudio de S9 hepática de ser humano.

Fig. 6I: Gráfico que muestra la formación de LB100 en el estudio de S9 hepática de rata.

Fig. 6J: Gráfico que muestra la formación de LB100 en el estudio de S9 hepática de mono.

Fig. 6K: Gráfico que muestra la formación de LB100 en el estudio de S9 hepática de ser humano.

Fig. 6L: Gráfico que muestra la formación de LB100 en el estudio de S9 hepática de rata.

Fig. 7: Sumario de resultados de estudios de semivida en sangre entera para LB151, LB100 POM y carbonato de LB-100.

Fig. 8A: Gráfico que muestra la formación de Endothal en el estudio de sangre entera de perro.

Fig. 8B: Gráfico que muestra la formación de Endothal en el estudio de sangre entera de ser humano.

Fig. 8C: Gráfico que muestra la formación de Endothal en el estudio de sangre entera de mono.

Fig. 8D: Gráfico que muestra la formación de Endothal en el estudio de sangre entera de rata.

Fig. 8E: Gráfico que muestra la formación de LB100 en el estudio de sangre entera de perro.

Fig. 8F: Gráfico que muestra la formación de LB100 en el estudio de sangre entera de ser humano.

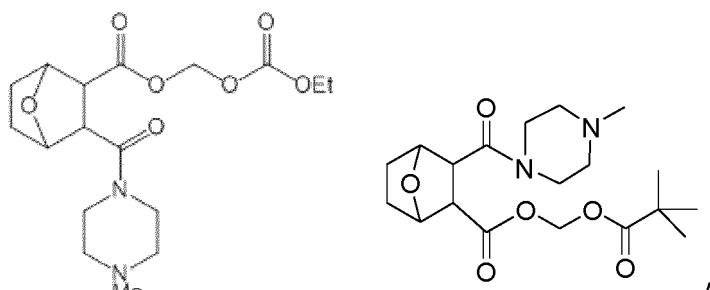
Fig. 8G: Gráfico que muestra la formación de LB100 en el estudio de sangre entera de mono.

Fig. 8H: Gráfico que muestra la formación de LB100 en el estudio de sangre entera de rata.

Fig. 9: Sumario de resultados de estudios de permeabilidad de MDCK-MDR1 para LB151, LB100 POM y carbonato de LB-100.

10 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un compuesto que tiene la estructura:



15

o sal del compuesto.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

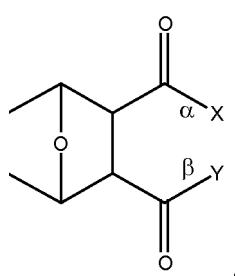
20 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un agente anticancerígeno, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica en donde el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un liposoma.

30 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica en donde el compuesto está contenido en un liposoma o en una microesfera, o el compuesto y el agente anticancerígeno están contenidos en un liposoma o en una microesfera. Los compuestos de la presente invención también se pueden usar en un método para el suministro *in vivo* de Endothal a una célula diana en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto un compuesto de la presente invención, en donde uno o dos enlaces del compuesto están sujetos a escisión hidrolítica *in vivo* en el sujeto, para así suministrar 35 Endothal a la célula diana en el sujeto.

En algunas realizaciones del método anterior, el compuesto tiene la estructura



40

en donde uno o ambos de entre el enlace α y enlace β están sujetos a la escisión hidrolítica *in vivo* en el sujeto.

En algunas realizaciones del método anterior, el suministro de Endothal a la célula diana en el sujeto es eficaz para tratar una enfermedad en el sujeto afectado de la enfermedad.

45

En algunas realizaciones del método anterior, la enfermedad es cáncer.

- En algunas realizaciones del método anterior, el cáncer es un cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón de células grandes, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de estómago, cáncer de hígado, adenocarcinoma de ovario, carcinoma de páncreas, carcinoma de próstata, leucemia promielocítica, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, linfoma, linfoma no Hodgkin o linfoma de Hodgkin.
- 5 En algunas realizaciones del método anterior, el cáncer es un cáncer cerebral.
- 10 En algunas realizaciones del método anterior, el cáncer cerebral es un glioma, astrocitoma pilocítico, astrocitoma difuso de bajo grado, astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme, oligodendrogioma, ependimoma, meningioma, tumor de glándula pituitaria, linfoma primario del SNC, meduloblastoma, craneofaringioma o glioma pontino intrínseco difuso.
- 15 En algunas realizaciones del método anterior, que comprende además administrar al sujeto un agente anticancerígeno.
- 20 En algunas realizaciones del método anterior, el agente anticancerígeno se selecciona entre radiación x o radiación ionizante.
- 25 En algunas realizaciones del método anterior, la célula diana es una célula cancerosa.
- 30 En algunas realizaciones del método anterior, la célula cancerosa es una célula de cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón de células grandes, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de estómago, cáncer de hígado, adenocarcinoma de ovario, carcinoma de páncreas, carcinoma de próstata, leucemia promielocítica, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, linfoma, linfoma no Hodgkin o linfoma de Hodgkin.
- 35 En algunas realizaciones del método anterior, en donde la célula cancerosa es una célula de cáncer de cerebro.
- 40 En algunas realizaciones del método anterior, en donde la célula de cáncer de cerebro es una célula de glioma, astrocitoma pilocítico, astrocitoma difuso de bajo grado, astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme, oligodendrogioma, ependimoma, meningioma, tumor de glándula pituitaria, linfoma primario del SNC, meduloblastoma, craneofaringioma o glioma pontino intrínseco difuso.
- 45 Los compuestos de la presente invención también pueden usarse en un método para el suministro *in vivo* de Endothal y un agente anticancerígeno a una célula cancerosa en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto un compuesto de la presente invención para suministrar de ese modo el Endothal y el agente anticancerígeno a la célula cancerosa en el sujeto.
- 50 En algunas realizaciones del método anterior, La administración del Endothal y el agente anticancerígeno a la célula cancerosa en el sujeto es eficaz para tratar un cáncer en un sujeto afectado del cáncer.
- 55 En algunas realizaciones del método anterior, el cáncer es un cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón de células grandes, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de estómago, cáncer de hígado, adenocarcinoma de ovario, carcinoma de páncreas, carcinoma de próstata, leucemia promielocítica, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, linfoma, linfoma no Hodgkin o linfoma de Hodgkin.
- 60 En algunas realizaciones del método anterior, el cáncer es un cáncer cerebral.
- 65 En algunas realizaciones del método anterior, el cáncer cerebral es un glioma, astrocitoma pilocítico, astrocitoma difuso de bajo grado, astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme, oligodendrogioma, ependimoma, meningioma, tumor de glándula pituitaria, linfoma primario del SNC, meduloblastoma, craneofaringioma o glioma pontino intrínseco difuso.
- En algunas realizaciones del método anterior, la célula cancerosa es una célula de cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón de células grandes, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de estómago, cáncer de hígado, adenocarcinoma de ovario, carcinoma de páncreas, carcinoma de próstata, leucemia promielocítica,

leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, linfoma, linfoma no Hodgkin o linfoma de Hodgkin.

En algunas realizaciones del método anterior, la célula cancerosa es una célula de cáncer de cerebro.

5 En algunas realizaciones del método anterior, la célula de cáncer de cerebro es una célula de glioma, astrocitoma pilocítico, astrocitoma difuso de bajo grado, astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, ependimoma, meningioma, tumor de glándula pituitaria, linfoma primario del SNC, meduloblastoma, craneofaringioma o glioma pontino intrínseco difuso.

10 En algunas realizaciones del método anterior, la célula diana está en el cerebro del sujeto.

En algunas realizaciones del método anterior, el Endothal y el agente anticancerígeno se suministran a una célula cancerosa en el cerebro del sujeto.

15 15 En algunas realizaciones del método anterior, el compuesto se administra conjuntamente con un agente anticancerígeno.

20 Los compuestos de la presente invención pueden usarse en un método de tratamiento de un sujeto afectado de cáncer que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la presente invención.

25 Los compuestos de la presente invención pueden usarse en un método de potenciación de la actividad anticancerígena de un agente anticancerígeno en un sujeto afectado de un cáncer, que comprende administrar al sujeto el compuesto de la presente invención en una cantidad eficaz para potenciar la actividad anticancerígena del agente anticancerígeno.

Los compuestos de la presente invención pueden usarse en un método de tratamiento de un sujeto afectado de cáncer que comprende administrar periódicamente al sujeto:

30 a) una cantidad del compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y
b) un agente anticancerígeno,

en donde las cantidades, cuando se toman juntas, son más eficaces para tratar al sujeto que cuando cada agente se administra solo en la misma cantidad.

35 35 La presente invención proporciona el uso del compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un agente anticancerígeno en la preparación de una combinación para tratar a un sujeto afectado de cáncer, en donde la cantidad del compuesto y la cantidad del agente anticancerígeno se administran de forma simultánea o contemporánea.

40 40 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad del compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de un sujeto afectado de cáncer como una terapia adicional, o en combinación con, o simultánea, contemporánea o concomitantemente con un agente anticancerígeno.

45 45 En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso como una terapia complementaria o en combinación con un agente anticancerígeno en el tratamiento de un sujeto afectado de cáncer.

50 50 En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un agente anticancerígeno para el tratamiento de un sujeto afectado de cáncer, en donde el compuesto y el agente anticancerígeno se administran simultánea, separada o secuencialmente.

55 En algunas realizaciones, un producto que contiene una cantidad del compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una cantidad de un agente anticancerígeno para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de un sujeto que padece cáncer.

60 En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento del cáncer. En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con un agente anticancerígeno para su uso en el tratamiento del cáncer.

65 En algunas realizaciones de cualquiera de los anteriores métodos, usos, composiciones farmacéuticas, compuestos o productos, el cáncer es cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón de células grandes, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de estómago, cáncer de hígado, adenocarcinoma de ovario, carcinoma de páncreas, carcinoma de próstata, leucemia promielocítica, leucemia mielocítica crónica, leucemia

linfocítica aguda, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, linfoma, linfoma no Hodgkin o linfoma de Hodgkin.

En algunas realizaciones de cualquiera de los anteriores métodos, usos, composiciones farmacéuticas, compuestos o productos, el cáncer es cáncer cerebral.

5 En algunas realizaciones de cualquiera de los anteriores métodos, usos, composiciones farmacéuticas, compuestos o productos, el cáncer cerebral es un glioma, astrocitoma pilocítico, astrocitoma difuso de bajo grado, astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme, oligodendrogioma, ependimoma, meningioma, tumor de glándula pituitaria, linfoma primario del SNC, meduloblastoma, craneofaringioma o glioma pontino intrínseco difuso.

10 En algunas realizaciones de cualquiera de los anteriores métodos, usos, composiciones farmacéuticas, compuestos o productos, El compuesto atraviesa la barrera hematoencefálica del sujeto.

15 En algunas realizaciones de cualquiera de los anteriores métodos, usos, composiciones farmacéuticas, compuestos o productos, El compuesto y/o un metabolito del compuesto atraviesa la barrera hematoencefálica del sujeto.

Los compuestos de la presente invención pueden usarse en un método de inhibición de la proliferación o de inducción de la apoptosis de una célula cancerosa en un sujeto humano, que comprende administrar al sujeto:

20 a) el compuesto de la presente invención, o una sal del compuesto, en una cantidad eficaz para inhibir la proliferación o para inducir la apoptosis de la célula cancerosa; y

b) un agente anticancerígeno en una cantidad eficaz para inhibir la proliferación o para inducir la apoptosis de la célula cancerosa.

25 Los compuestos de la presente invención pueden usarse en un método de inhibición de la proliferación o inducción de la apoptosis de una célula cancerosa en un sujeto humano que sobreexpresa la proteína tumoral controlada por la traducción (TCTP, *Translationally Controlled Tumour Protein*) que comprende administrar al sujeto

30 a) el compuesto de la presente invención, o una sal del compuesto, en una cantidad eficaz para inhibir la proliferación o para inducir la apoptosis de la célula cancerosa; y

b) un agente anticancerígeno en una cantidad eficaz para inhibir la proliferación o para inducir la apoptosis de la célula cancerosa.

35 35 En algunas realizaciones de los métodos anteriores, la célula cancerosa no sobreexpresa N-CoR.

En algunas realizaciones de cualquiera de los anteriores métodos, usos, composiciones farmacéuticas, compuestos o productos, el agente anticancerígeno se selecciona entre radiación x o radiación ionizante.

40 En algunas realizaciones de cualquiera de los anteriores métodos, usos, composiciones farmacéuticas, compuestos o productos, el agente anticancerígeno se selecciona entre un agente que daña el ADN, un agente de intercalación de ADN, un agente estabilizante de microtúbulos, un agente desestabilizador de microtúbulos, una toxina del huso, abarelix, aldesleucina, alemtuzumab, alitertinoína, alopurinol, altretamina, amifostina, anakinra, anastrozol, trióxido de

45 arsénico, asparaginasa, azacitidina, bevacizumab, bexaroteno, bleomicina, bortezomib, busulfano, calusterona, capecitabina, carboplatino, carmustina, celecoxib, cetuximab, clorambucilo, cisplatino, cladribina, clofarabina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazine, dactinomicina, actinomicina D, dalteparina sodio, darbepoetina alfa, dasatinib, daunorrubicina, daunomicina, decitabina, denileucina, dexrazoxano, docetaxel, doxorubicina, propionato de

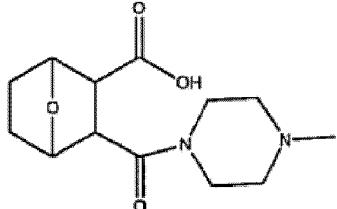
50 dromostanolona, exulizumab, epirrubicina, epoetina alfa, erlotinib, estramustina, fosfato de etopósido, etopósido, VP-16, exemestano, fentanil citrato, filgrastim, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, fulvestrant, gefitinib, gemcitabina, acetato de goserelina, acetato de histrelina, hidroxurea, ibritumomab tiuxetan, idarrubicina, ifosfamida, mesilato de imatinib, interferón alfa 2a, interferón alfa 2b, irinotecán, lapatinib ditosilato, lenalidomida, letrozol, leucovorina, acetato de leuprórido, levamisol, lomustina, mecloretamina, acetato de megestrol, melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, metoxsalen, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, fenpropionato de nandrolona, nelarabina,

55 nefetumomab, oprelvekin, oxaliplatin, paclitaxel, palifermina, pamidronato, panitumumab, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim, peginterferón alfa 2b, pemtrexed disódico, pentostatina, pipobromano, plicamicina, mitramicina, porfímero sódico, procarbazina, quinacrina, rasburicasa, rituximab, sargamostim, sorafenib, estreptozocina, sunitinib, maleato de sunitinib, talco, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, VM-26, testolactona, talidomida, tioguanina, G-TG, tiotepa, topotecán, toremifeno, tositumomab, trastuzumab, tretinoína ATRA, mostaza de

60 uracilo, valrubicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina, vorinostat, zoledronato, ácido zolendrónico, abraxane y brentuximab vedotina.

En algunas realizaciones de cualquiera de los anteriores métodos, usos, composiciones farmacéuticas, compuestos o productos, el sujeto es un ser humano.

65 En algunas realizaciones de cualquiera de los anteriores métodos, usos, composiciones farmacéuticas, compuestos

- o productos, el cáncer es uno cualquiera de entre cáncer corticosuprarrenal, cáncer de vejiga, osteosarcoma, cáncer de cuello uterino, esofágico, de vesícula biliar, cáncer de cabeza y cuello, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer renal, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer rectal, cáncer de tiroides, cáncer de garganta, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de colon, 5 cáncer de pulmón de células grandes, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de estómago, cáncer de hígado, adenocarcinoma de ovario, carcinoma de páncreas, carcinoma de próstata, leucemia promielocítica, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, cáncer colorrectal, cáncer de ovario o carcinoma hepatocelular.
- 10 En una realización, una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la presente invención. En una realización, una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 En una realización del método, el compuesto de la presente invención inhibe la actividad PP2A en el sujeto. En una realización del método, el compuesto de la presente invención inhibe la actividad PP2A en el cerebro del sujeto. En una realización del método, el compuesto de la presente invención atraviesa la barrera hematoencefálica del sujeto.
- 20 En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención son derivados de éster del compuesto 100 y sirven como profármacos del compuesto 100, en donde el compuesto 100 tiene la estructura:
- 

 (LB100) .
- 25 En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención son derivados de éster de 100 y sirven como profármacos que pueden ser convertidos en 100 por las esterasas séricas y/o las esterasas cerebrales.
- 30 En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención son derivados del compuesto 100 y sirven como profármacos que pueden ser convertidos en Endothal por esterasas séricas y/o esterasas cerebrales.
- 35 En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención son derivados del compuesto 100 y sirven como profármacos que atraviesan la barrera hematoencefálica y liberan Endothal al cerebro.
- 40 45 En algunas realizaciones, la administración de un profármaco de Endotelial es más eficaz para el suministro del Endothal a las células diana en un sujeto que la administración del propio Endothal. El perfil metabólico del Endothal es tal que la administración de un profármaco de Endothal es más eficaz para suministrar el Endothal a las células diana en un sujeto que la administración del propio Endothal.
- 50 En algunas realizaciones, el método en donde el compuesto se convierte primero en el compuesto 100 *in vivo*, que, a su vez, se convierte en Endothal *in vivo*.
- 55 Los compuestos desvelados en el presente documento actúan como profármacos de Endothal, alterando el metabolismo mediante el enmascaramiento de uno o dos grupos ácidos con una amida o una fracción éster. El diseño del profármaco reducirá la toxicidad y aumentará la exposición sistémica del Endothal en el sujeto.
- En algunas realizaciones del método de suministro, una composición farmacéutica que comprende el compuesto y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- Tal y como se usa en el presente documento, un "síntoma" asociado con una enfermedad incluye cualquier manifestación clínica o de laboratorio asociada con la enfermedad, y no se limita a lo que el sujeto puede sentir u observar.
- Tal y como se usa en el presente documento, "tratamiento de las enfermedades", "tratamiento de la lesión" o "tratamiento", por ejemplo, de una enfermedad abarca inducir la inhibición, regresión o estancamiento de la enfermedad o lesión, o un síntoma o una afección asociado con la enfermedad o lesión.
- Tal y como se usa en el presente documento, la "inhibición" de la enfermedad abarca prevenir o reducir la progresión

de la enfermedad y/o la complicación de la enfermedad en el sujeto.

Tal y como se usa en el presente documento, "sobreexpresar N-CoR" significa que el nivel del correpresor del receptor nuclear (N-CoR) expresado en las células del tejido analizado es elevado en comparación con los niveles de N-CoR medidos en células sanas normales del mismo tipo de tejido en condiciones análogas. El correpresor del receptor nuclear (N-CoR) de la presente invención puede ser cualquier molécula que se una al dominio de unión al ligando del receptor de la hormona tiroidea unida al ADN (T3R) y del receptor de ácido retinoico (RAR) (Patente de los Estados Unidos n.º 6.949.624, Liu *et al.*). Los ejemplos de tumores que sobreexpresan N-CoR pueden incluir glioblastoma multiforme, cáncer de mama (Myers *et al.* 2005), cáncer colorrectal (Giannini y Cavallini 2005), carcinoma de pulmón microcítico (Waters *et al.*, 2004) o cáncer de ovario (Havrilesky *et al.*, 2001).

Tal y como se usa en el presente documento, el término "fracción de aminoácido" o "AA" se refiere a cualquier aminoácido natural o no natural, incluyendo su forma de sal, derivado de éster, derivado de amina protegida y/o sus formas isoméricas. Los aminoácidos comprenden, a modo de ejemplo no limitante: Agmatina, Alanina Beta-Alanina, 15 Arginina, Asparagina, Ácido aspártico, Cisteína, Glutamina, Ácido glutámico, Glicina, Histidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Fenil beta-alanina, Prolina, Serina, Treonina, Triptófano, Tirosina y Valina. Los aminoácidos pueden ser aminoácidos L o D. El aminoácido puede unirse a través del ácido para formar un enlazador de éster o a través de la amina para formar un enlazador de amina secundaria.

20 Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "fracción de aminoácido" se refiere a H, OH, alquilo, bencilo, metilo, etilo, propilo, butilo, isopropilo, isobutilo, -(CH₂)C(O)NH₂, -(CH₂)₂C(O)NH₂, -(CH₂)C(O)OH, -(CH₂)₂C(O)OH, -(CH₂)₅C(O)OH, -CH(CH₃)CH₂CH₃, propilo, butilo, -(CH₂CH₂CH₂)NH₂, -(CH₂)SH, -(CH₂CH₂)SH, -(CH₂)SCH₃, -(CH₂CH₂)SCH₃, -(CH₂CH₂)OH, -(CH₂)OH, -(CH₂)-indol, -(CH₂)-tiofeno, -(CH₂)-imidazol, -CH(OH)CH₃, -CH(CH₃)C(SH)(CH₃)₂, -CH₂(4-metoxifenilo) o -(CH₂)₃NHC(NH)NH₂.

25 Tal y como se usa en el presente documento, "alquilo" pretende incluir grupos de hidrocarburo alifáticos saturados tanto de cadena ramificada como lineal que tienen el número de átomos de carbono especificado. Por lo tanto, se define que C₁-C_n como en "alquilo C₁-C_n" incluye grupos que tienen 1, 2, n-1 o n átomos de carbono en una disposición lineal o ramificada, y específicamente incluye metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, etcétera. Una realización puede ser alquilo C₁-C₂₀, alquilo C₂-C₂₀, alquilo C₃-C₂₀, alquilo C₄-C₂₀, etcétera. Una realización puede ser alquilo C₁-C₃₀, alquilo C₂-C₃₀, alquilo C₃-C₃₀, alquilo C₄-C₃₀, etcétera. "Alcoxi" representa un grupo alquilo como se ha descrito anteriormente unido a través de un puente de oxígeno.

30 El término "alquenilo" se refiere a un radical hidrocarbonado no aromático, lineal o ramificado, que contiene al menos 1 enlace doble carbono a carbono, pudiendo estar presente hasta el máximo número posible de enlaces dobles carbono-carbono no aromáticos. Por lo tanto, alquenilo C₂-C_n se define para incluir grupos que tienen 1, 2...., n-1 or n átomos de carbono. Por ejemplo, "alquenilo C₂-C₆" significa un radical alquenilo que tiene 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono, y al menos 1 doble enlace carbono-carbono, y hasta, por ejemplo, 3 dobles enlaces carbono-carbono en el caso de un alquenilo C₆, respectivamente. Los grupos alquenilo incluyen etenilo, propenilo, butenilo y ciclohexenilo. Una realización puede ser alquenilo C₂-C₁₂, alquenilo C₃-C₁₂, alquenilo C₂-C₂₀, alquenilo C₃-C₂₀, alquenilo C₂-C₃₀ o alquenilo C₃-C₃₀.

35 El término "alquinilo" se refiere a un radical hidrocarbonado lineal o ramificado, que contiene al menos 1 triple enlace carbono a carbono, pudiendo estar presentes hasta el máximo número posible de triples enlaces carbono-carbono no aromáticos. Por lo tanto, alquinilo C₂-C_n se define para incluir grupos que tienen 1, 2...., n-1 or n átomos de carbono. Por ejemplo, "alquinilo C₂-C₆" significa un radical alquinilo que tiene 2 o 3 átomos de carbono y 1 triple enlace carbono-carbono, o que tiene 4 o 5 átomos de carbono y hasta 2 triples enlaces carbono-carbono, o que tiene 6 átomos de carbono y hasta 3 triples enlaces carbono-carbono. Los grupos alquinilo incluyen etinilo, propinilo y butinilo. Como se ha descrito anteriormente con respecto al alquilo, la parte lineal o ramificada del grupo alquinilo puede contener triples enlaces y puede estar sustituida si se indica un grupo alquinilo sustituido. Una realización puede ser un alquinilo C₂-C_n. Una realización puede ser alquinilo C₂-C₁₂ o alquinilo C₃-C₁₂, alquinilo C₂-C₂₀, alquinilo C₃-C₂₀, alquinilo C₂-C₃₀ o alquinilo C₃-C₃₀.

40 45 50 55 60 55 Tal y como se usa en el presente documento, "arilo" pretende indicar cualquier anillo de carbono monocíclico o bicíclico estable de hasta 10 átomos en cada anillo, en donde al menos un anillo es aromático. Los ejemplos de dichos elementos arilo incluyen fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, bifenilo, fenantrilo, antrilo o acenaftilo. En los casos en los que el sustituyente arilo es bicíclico y un anillo es no aromático, se entiende que la unión es a través del anillo aromático. Los arilos sustituidos incluidos en la presente invención incluyen la sustitución en cualquier posición adecuada con aminas, aminas sustituidas, alquilaminas, hidroxi y alquil-hidroxi, en donde la parte "alquilo" de las alquilaminas y de los alquilhidroxi es un alquilo C₁-C_n como se ha definido anteriormente. Las aminas sustituidas pueden estar sustituidas con grupos alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo como se ha definido anteriormente.

65 Los sustituyentes alquilo, alquenilo, alquinilo y arilo pueden estar sin sustituir o sin sustituir, salvo que se defina específicamente de otra manera. Por ejemplo, un alquilo (C₁-C₆) puede estar sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre OH, oxo, halógeno, alcoxi, dialquilamino o heterociclico, tal como el morfolinilo, piperidinilo,

etcétera.

Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo pueden estar sustituidos adicionalmente reemplazando uno o más átomos de hidrógeno por grupos que no son de hidrógeno descritos en el presente documento en la medida de lo posible. Estos incluyen, pero sin limitación, halo, hidroxi, mercapto, amino, carboxi, ciano y carbamoilo.

El término "sustituido", como se usa en el presente documento, significa que una estructura dada tiene un sustituyente que puede ser un grupo alquilo, alquenilo o arilo como se ha definido anteriormente. Se considerará que el término incluye múltiples grados de sustitución por un sustituto designado. Cuando se desvelan o reivindican múltiples fracciones sustituyentes, el compuesto sustituido puede sustituirse independientemente con una o más de las fracciones sustituyentes desveladas o reivindicadas, en singular o en plural. Por sustitución independiente, se entiende que los (dos o más) sustituyentes pueden ser iguales o diferentes.

Ejemplos de grupos sustituyentes incluyen los grupos funcionales descritos anteriormente y halógenos (es decir, F, Cl, Br y I); grupos alquilo, tales como metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, *terc*-butilo y trifluorometilo; hidroxilo; grupos alcoxi, tales como metoxi, etoxi, *n*-propoxi e isopropoxi; grupos ariloxi, tales como fenoxi; arilalquinoxiloxi, tales como benciloxi (fenilmethoxi) y *p*-trifluorometilbenciloxi (4-trifluorometilfenilmethoxi); grupos heteroariloxi; grupos sulfonilo, tales como trifluorometanosulfonilo, metanosulfonilo y *p*-toluenosulfonilo; nitro, nitrosilo; mercapto; grupos sulfonilo, tales como metilsulfanilo, etilsulfanilo y propilsulfanilo; ciano; grupos amino, tales como amino, metilamino, dimetilamino, etilamino y dietilamino; y carboxilo. Cuando se desvelan o reivindican múltiples fracciones sustituyentes, el compuesto sustituido puede sustituirse independientemente con una o más de las fracciones sustituyentes desveladas o reivindicadas, en singular o en plural. Por sustitución independiente, se entiende que los (dos o más) sustituyentes pueden ser iguales o diferentes.

Los sustituyentes pueden estar sustituidos o no sustituidos, salvo que se defina específicamente de otra manera.

Los grupos alquilo, heteroalquilo, monociclo, biciclo, arilo, heteroarilo y heterociclo se pueden sustituir además reemplazando uno o más átomos de hidrógeno por grupos alternativos que no sean hidrógeno. Estos incluyen, pero sin limitación, halo, hidroxi, mercapto, amino, carboxi, ciano y carbamoilo.

Se entiende que los sustituyentes y los patrones de sustitución pueden ser seleccionados por un experto en la materia, para proporcionar compuestos que sean químicamente estables y que puedan sintetizarse fácilmente mediante técnicas conocidas en la técnica, así como los métodos expuestos a continuación, a partir de materiales de partida fácilmente disponibles. Si un sustituyente a su vez está sustituido con más de un grupo, se entiende que estos múltiples grupos pueden estar en el mismo átomo de carbono o en diferentes átomos de carbonos, siempre que produzcan una estructura estable.

Tal y como se usa en el presente documento, un "compuesto" es una molécula pequeña que no incluye proteínas, péptidos ni aminoácidos.

Tal y como se usa en el presente documento, un compuesto "aislado" es un compuesto aislado de una mezcla de reacción en bruto o de una fuente natural después de un acto afirmativo de aislamiento. El acto de aislamiento implica necesariamente separar el compuesto de los otros componentes de la mezcla o fuente natural, dejando algunas impurezas, productos secundarios desconocidos y las cantidades residuales de los otros componentes. La purificación es un ejemplo de un acto afirmativo de aislamiento.

"Administrar al sujeto" o "administrar al paciente (humano)" significa dar, dispensar o aplicar medicamentos, fármacos o remedios a un sujeto/paciente para aliviar, curar o reducir los síntomas asociados con una afección, por ejemplo, una afección patológica. La administración puede ser administración periódica. Tal y como se usa en el presente documento, "administración periódica" significa administración repetida/recurrente separada por un período de tiempo. El período de tiempo entre administraciones es preferentemente uniforme de vez en cuando. La administración periódica puede incluir la administración, por ejemplo, una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, semanalmente, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana y así sucesivamente, etc.

Tal y como se usa en el presente documento, "la administración" de un agente puede realizarse usando cualquiera de los distintos métodos o sistemas de suministro bien conocidos por los expertos en la materia. La administración se puede realizar, por ejemplo, por vía oral, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, transdérmica, sublingual, intramuscular, rectal, transbucal, intranasal, liposomal, mediante inhalación, por vía vaginal, intraocular, mediante suministro local, por vía subcutánea, intraadiposa, intraarticular, intratecal, en un ventrículo cerebral, por vía intraventricular, intratumoral, en parénquima cerebral o por vía intraparenquimal.

Tal y como se usa en el presente documento, "combinación" significa un conjunto de reactivos para su uso en terapia, ya sea por administración simultánea o contemporánea. La administración simultánea se refiere a la administración de una mezcla (ya sea una mezcla verdadera, una suspensión, una emulsión u otra combinación física) del compuesto y del agente anticancerígeno. La combinación puede ser la mezcla o recipientes separados que se combinan justo

antes de la administración. La administración contemporánea se refiere a la administración por separado, o en ocasiones, lo suficientemente juntas como para que se observe una actividad sinérgica en relación con la actividad de cualquiera de ellos individualmente.

- 5 Tal y como se usa en el presente documento, "administración concomitante" o administrar "concomitantemente" significa la administración de dos agentes administrados en un tiempo lo suficientemente cercano como para permitir que los efectos terapéuticos individuales de cada agente se superpongan.
- 10 Tal y como se usa en el presente documento, "complemento" o "terapia complementaria" significa un conjunto de reactivos para su uso en terapia, en donde el sujeto que recibe la terapia comienza un primer régimen de tratamiento de uno o más reactivos antes de comenzar un segundo régimen de tratamiento de uno o más reactivos diferentes además del primer régimen de tratamiento, para que no todos los reactivos usados en la terapia se inicien al mismo tiempo.
- 15 Los siguientes sistemas de suministro, que emplean diversos vehículos farmacéuticos usados habitualmente, pueden usarse, pero son solo representativos de los muchos sistemas posibles previstos para administrar composiciones de acuerdo con la invención.
- 20 Los sistemas de suministro de fármacos inyectables incluyen soluciones, suspensiones, geles, microesferas e inyectables poliméricos, y pueden comprender excipientes tales como agentes que alteran la solubilidad (por ejemplo, etanol, propilenglicol y sacarosa) y polímeros (por ejemplo, policaprilactonas y PLGA).
- 25 Otros sistemas de suministro de fármacos inyectables incluyen soluciones, suspensiones, geles. Los sistemas de suministro orales incluyen comprimidos y cápsulas. Estos pueden contener excipientes como aglutinantes (por ejemplo, hidroxipropilmelcelulosa, polivinilpirilodona, otros materiales celulósicos y almidón), diluyentes (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, almidón, fosfato dicálcico y materiales celulósicos), agentes desintegrantes (por ejemplo, polímeros de almidón y materiales celulósicos) y agentes lubricantes (por ejemplo, estearatos y talco).
- 30 Los sistemas implantables incluyen varillas y discos, y pueden contener excipientes tales como PLGA y policaprilactona.
- 35 Los sistemas de suministro orales incluyen comprimidos y cápsulas. Estos pueden contener excipientes como aglutinantes (por ejemplo, hidroxipropilmelcelulosa, polivinilpirilodona, otros materiales celulósicos y almidón), diluyentes (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, almidón, fosfato dicálcico y materiales celulósicos), agentes desintegrantes (por ejemplo, polímeros de almidón y materiales celulósicos) y agentes lubricantes (por ejemplo, estearatos y talco).
- 40 Los sistemas de suministro transmucosa incluyen parches, comprimidos, supositorios, pesarios, geles y cremas, y pueden contener excipientes tales como solubilizantes y potenciadores (por ejemplo, propilenglicol, sales biliares y aminoácidos) y otros vehículos (por ejemplo, polietilenglicol, ésteres y derivados de ácidos grasos, y polímeros hidrófilos tales como hidroxipropilmelcelulosa y ácido hialurónico).
- 45 Los sistemas de suministro cutáneos incluyen, por ejemplo, geles acuosos y no acuosos, cremas, emulsiones múltiples, microemulsiones, liposomas, pomadas, soluciones acuosas y no acuosas, lociones, aerosoles, bases y polvos de hidrocarburos, y pueden contener excipientes tales como solubilizantes, potenciadores de la permeación (por ejemplo, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos y aminoácidos) y polímeros hidrófilos (por ejemplo, policarbofilo y polivinilpirrolidona). En una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un liposoma o un potenciador transdérmico.
- 50 Las soluciones, las suspensiones y los polvos para sistemas de suministro reconstituyibles incluyen vehículos tales como agentes de suspensión (por ejemplo, gomas, zantanios, celulósicos y azúcares), humectantes (por ejemplo, sorbitol), solubilizantes (por ejemplo, etanol, agua, PEG y propilenglicol), tensioactivos (por ejemplo, laurilsulfato de sodio, Spans, Tweens y cetilpiridina), conservantes y antioxidantes (por ejemplo, parabenos, vitaminas E y C, y ácido ascórbico), agentes antiaglomerantes, agentes de recubrimiento y agentes quelantes (por ejemplo, EDTA).
- 55 Tal y como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o excipiente que es adecuado para su uso con seres humanos y/o animales sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación y respuesta alérgica) proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable. Puede ser un disolvente farmacéuticamente aceptable, agente de suspensión o vehículo, para suministrar los compuestos instantáneos al sujeto.
- 60 Los compuestos usados en el método de la presente invención pueden estar en forma de sal. Tal y como se usa en el presente documento, una "sal" es una sal de los presentes compuestos que se ha modificado produciendo sales ácidas o básicas de los compuestos. En el caso de los compuestos usados para tratar una infección o enfermedad, la sal es farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, sales de ácidos minerales u orgánicos de restos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de

restos ácidos tales como fenoles. Las sales se pueden preparar usando un ácido orgánico o inorgánico. Dichas sales de ácido son cloruros, bromuros, sulfatos, nitratos, fosfatos, sulfonatos, formiato, tartrato, maleato, malato, citrato, benzoato, salicilato, ascorbato y similares. Las sales de fenolato son las sales de metales alcalinotérreos, sodio, potasio o litio. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", en este sentido, se refiere a las sales de adición de ácido o de base inorgánicas y orgánicas, relativamente no tóxicas, de los compuestos de la presente invención. Estas sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos de la invención, o haciendo reaccionar por separado un compuesto purificado de la invención en su forma de base libre o de ácido libre con una base o un ácido orgánico o inorgánico adecuado, y aislando la sal así formada. Las sales representativas incluyen las sales bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, esteearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato y laurilsulfonato, y similares. (Véase, por ejemplo, Berge *et al.* (1977) "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci.* 66:1-19).

Tal y como se usa en el presente documento, una "cantidad" o "dosis" de un agente medida en miligramos se refiere a los miligramos de agente presentes en un producto farmacológico, independientemente de la forma del producto farmacológico.

Tal y como se usa en el presente documento, la expresión cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de un componente que es suficiente para producir una respuesta terapéutica deseada sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación o respuesta alérgica) proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable cuando se usa de la manera de la presente invención. La cantidad eficaz específica variará con factores tales como la afección en particular que se está tratando, el estado físico del paciente, el tipo de mamífero que se está tratando, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si existe), y las formulaciones específicas empleadas y la estructura de los compuestos o sus derivados.

Cuando se proporciona un intervalo en la memoria descriptiva, se entiende que el intervalo incluye todos los números enteros y 0,1 unidades decimales dentro de ese intervalo, y cualquier subintervalo del mismo. Por ejemplo, un intervalo del 77 al 90 % es una divulgación del 77, 78, 79, 80 y 81 %, etc.

Tal y como se usa en el presente documento, "aproximadamente" con respecto a un número establecido abarca un intervalo de + uno por ciento a -uno por ciento del valor establecido. Como ejemplo, aproximadamente 100 mg/kg, por tanto, incluye 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 100, 100,1, 100,2, 100,3, 100,4, 100,5, 100,6, 100,7, 100,8, 100,9 y 101 mg/kg. Por consiguiente, aproximadamente 100 mg/kg incluye, en una realización, 100 mg/kg.

Se entiende que cuando se proporciona un intervalo de parámetros, todos los números enteros dentro de ese intervalo, y décimas de los mismos, también son proporcionados por la invención. Por ejemplo, "0,2-5 mg/kg/día" es una divulgación de 0,2 mg/kg/día, 0,3 mg/kg/día, 0,4 mg/kg/día, 0,5 mg/kg/día, 0,6 mg/kg/día etc. hasta 5,0 mg/kg/día.

Cada realización desvelada en el presente documento se contempla como aplicable a cada una de las otras realizaciones desveladas. Por lo tanto, todas las combinaciones de los diversos elementos descritos en el presente documento están dentro del alcance de la invención.

La presente invención se entenderá mejor por referencia a los siguientes detalles experimentales, pero los expertos en la materia apreciarán fácilmente que los experimentos específicos detallados son solo ilustrativos de la invención como se describe de manera más completa en las reivindicaciones que figuran más adelante.

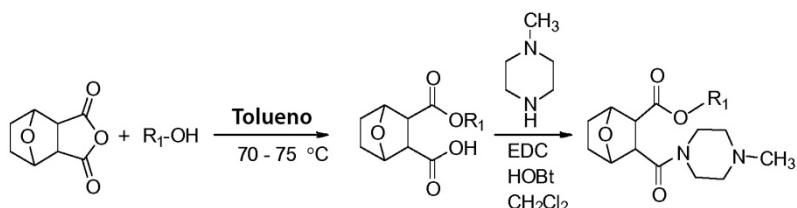
Detalles experimentales

50 Abreviaturas

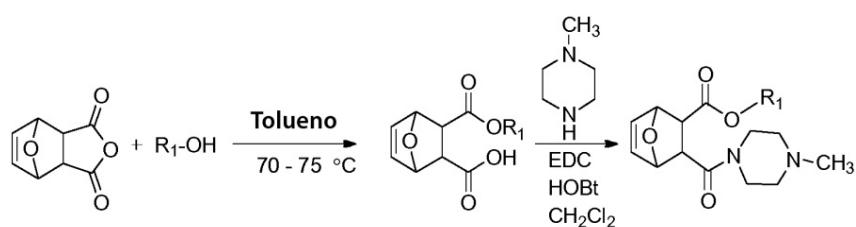
ACN -Acetonitrilo; AUC_{último} - Área bajo la curva de concentración-tiempo desde el punto de tiempo 0 hasta la última concentración cuantificable (*Area Under Curve*); AUC_{INF} - Área bajo la curva de concentración-tiempo desde el punto de tiempo 0 hasta el infinito (*Area Under Curve*); BQL - Por debajo del límite cuantificable (*Below Quantifiable Limit*); CL - Aclaramiento (*CLearance*); C_{máx} - Concentración máxima en plasma; h o H - hora; IV - Intravenosa; kg - kilogramo; l - litro; LC - Cromatografía líquida (*Liquid Chromatography*); LLOQ - Límite inferior de cuantificación (*Lower Limit of Quantification*); MeOH - Metanol; mg - miligramo; MS - espectrometría de masas (*Mass Spectrometry*); NH₄Oac - Acetato de amonio; PK - Farmacocinética (*Pharmacokinetics*) VO - Vía Oral; DT - Desviación Típica; t_{1/2} - Semivida terminal; T_{máx} - Tiempo hasta alcanzar la concentración máxima en plasma; V_{ss} - Volumen de distribución (en estado estacionario) (*Steady State*)

Materiales y métodos

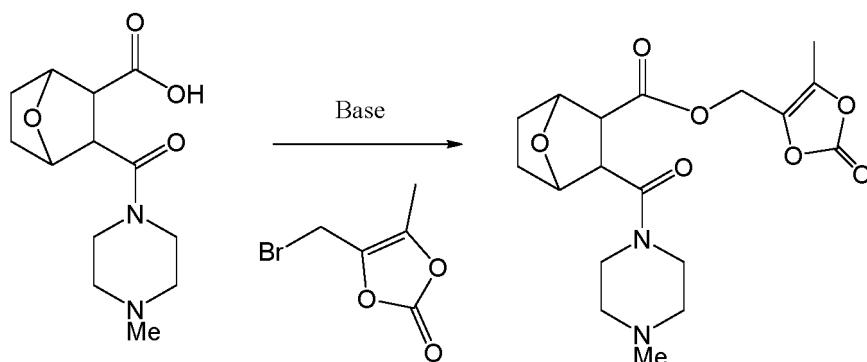
Método representativo de preparación de profármacos:



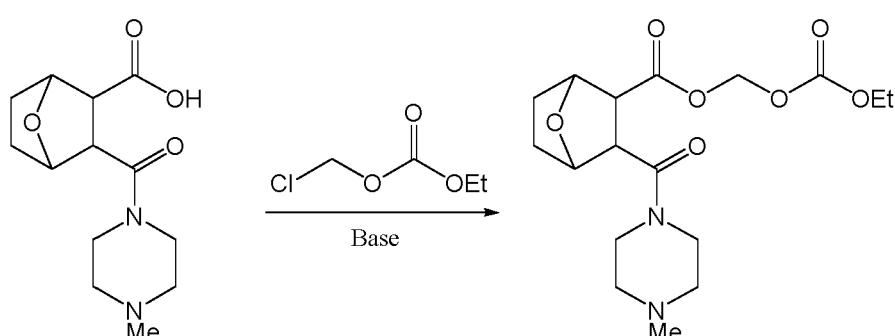
- 5 Se calienta una mezcla de anhídrido de exo-7-oxabici clo[2.2.1]heptano-2,3-dicarboxílico (50,0 mmol) y el alcohol alquílico apropiado (110,0 mmol) en tolueno a 70-75 °C durante la noche. Se concentra la mezcla de reacción en un evaporador rotatorio y se tritura el sólido en bruto con 20 ml de éter isopropílico mientras se calienta, y se filtra, dando un sólido. A la mezcla de éster alquílico en cloruro de metileno, se añade *N*-hidroxibenzotriazol (5 mmol) seguido de *N*-methylpiperazina (200 mmol) y EDC (75 mmol). Se agita la mezcla de reacción durante la noche a temperatura ambiente y se evapora a sequedad. Se purifica el producto mediante cromatografía en columna y recristalización.



- 10 Se calienta una mezcla de anhídrido de exo-3,6-Epoxi-1,2,3,6-tetrahidrofálico (50,0 mmol) y el alcohol alquílico apropiado (110,0 mmol) en tolueno a 70-75 °C durante la noche. Se concentra la mezcla de reacción en un evaporador rotatorio y se tritura el sólido en bruto con 20 ml de éter isopropílico mientras se calienta, y se filtra, dando un sólido. A la mezcla de éster alquílico en cloruro de metileno, se añade *N*-hidroxibenzotriazol (5 mmol) seguido de *N*-methylpiperazina (200 mmol) y EDC (75 mmol). Se agita la mezcla de reacción durante la noche a temperatura ambiente y se evapora a sequedad. Se purifica el producto mediante cromatografía en columna y recristalización.

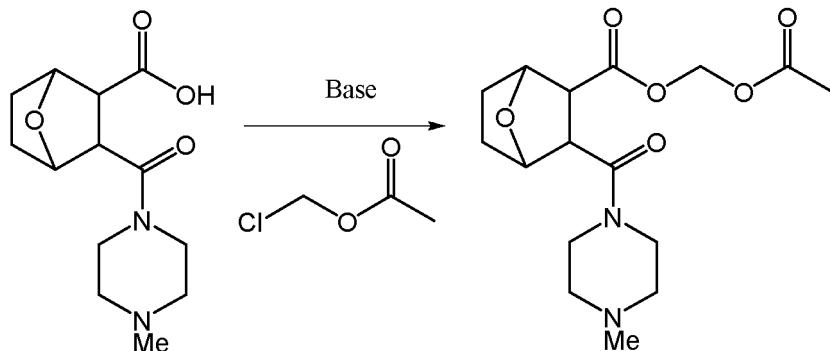


- 20 A la mezcla del ácido en cloruro de metileno, se añade TEA (1 mmol) seguido por el ácido (1 mmol) y bromuro de alquilo (1,5 mmol). Se agita la mezcla de reacción durante la noche a temperatura ambiente y se evapora a sequedad. Se purifica el producto mediante cromatografía en columna y recristalización, proporcionando el profármaco puro.

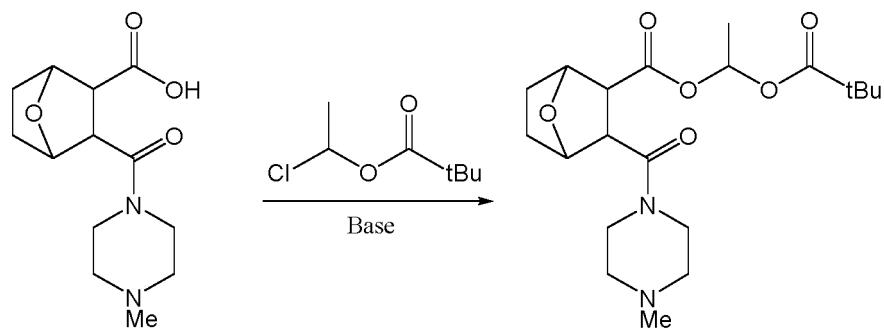


- 25 A la mezcla del ácido en cloruro de metileno, se añade TEA (1 mmol) seguido por el cloruro de alquilo (1,5 mmol). Se agita la mezcla de reacción durante la noche a temperatura ambiente y se evapora a sequedad. Se purifica el producto

mediante cromatografía en columna y recristalización, proporcionando el profármaco puro.

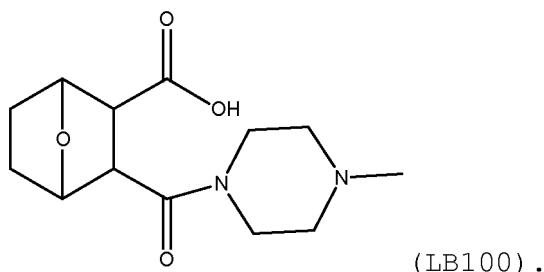


- 5 A la mezcla del ácido en cloruro de metíleno, se añade TEA (1 mmol) seguido por el cloruro de alquilo (1,5 mmol). Se agita la mezcla de reacción durante la noche a temperatura ambiente y se evapora a sequedad. Se purifica el producto mediante cromatografía en columna y recristalización, proporcionando el profármaco puro.

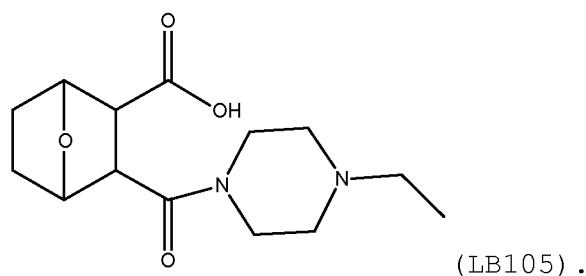


- 10 A la mezcla del ácido en cloruro de metíleno, se añade trietilamina (1 mmol) seguida por el cloruro de alquilo (1 mmol). Se agita la mezcla de reacción durante la noche a temperatura ambiente y se diluye con H₂O. La fase acuosa se extrae (3 veces) con diclorometano. Después, se lava la capa orgánica combinada (3 veces) con una solución saturada de bicarbonato sódico. La capa orgánica se concentra y se purifica luego mediante cromatografía en columna y recristalización, proporcionando el profármaco puro.
- 15

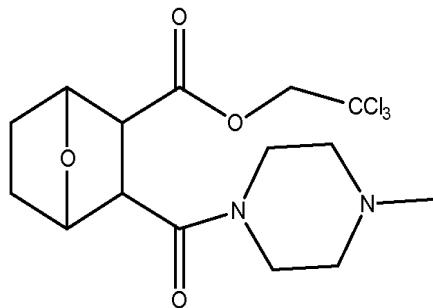
El compuesto 100 (no reivindicado) tiene la estructura:



- 20 El compuesto 105 (no reivindicado) tiene la estructura:



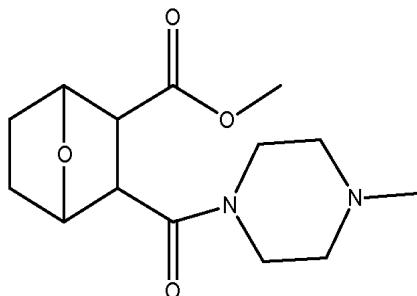
- 25 El compuesto 113 (no reivindicado) tiene la estructura:



(LB113) .

El compuesto 151 (no reivindicado) tiene la estructura:

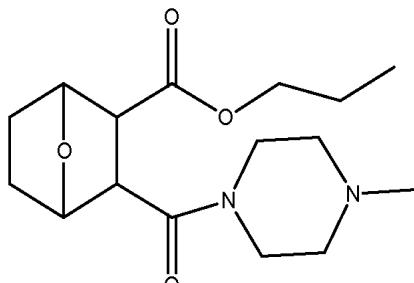
5



(LB151) .

El compuesto 153 (no reivindicado) tiene la estructura:

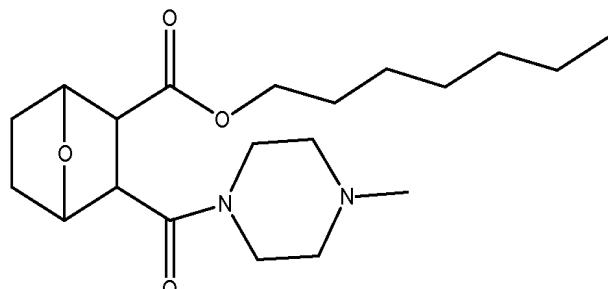
10



(LB153) .

El compuesto 157 (no reivindicado) tiene la estructura:

15



(LB157) .

Ejemplo 1. Estudio farmacocinético de los Compuestos 153 y 157

Los estudios farmacocinéticos sobre 153, 157 y su metabolito Endothal se realizaron en ratas SD. Se administraron 153 a 1,25 mg/kg y 157 a 1,5 mg/kg por vía VI y VO en ratas SD. Se extrajeron muestras de sangre, y de tejido hepático y cerebral en tiempos predeterminados de las ratas. Los métodos de LC/MS/MS se desarrollaron para determinar 153, 157 y Endothal en muestras de plasma, hígado y cerebro. En el informe, se presentaron las concentraciones de 153, 157 y Endothal en las muestras de plasma, hígado y cerebro tras la dosis intravenosa. También se calculó la biodisponibilidad de 153 y 157. El compuesto se diluyó poco antes de su uso en bicarbonato de sodio al 4 % para inyección estéril (esta es la solución pediátrica patrón de NaHCO₃ con un pH de aproximadamente 8,5).

25

Se asignó un total de 30 ratas SD hembra a este estudio como se muestra en la tabla que se presenta a continuación:

Grupo	Compuestos	Número de animal	Vía	Dosis	Volumen	2 ratas/Punto de tiempo	Muestreo
				(mg/kg)	(ml/kg)		
1	Control	2					
2	153	12	IV	1,25 mg/kg	5 ml/kg	15 min, 1 h, 2 h, 6 h 10 h, 24 h	Plasma, tejido hepático y cerebral
3	157	12	IV	1,5 mg/kg	5 ml/kg	15 min, 1 h, 2 h, 6 h 10 h, 24 h	Plasma, tejido hepático y cerebral
4	153	2	VO	1,25 mg/kg	5 ml/kg	30 min, 1 h, 2 h, 6 h 10 h, 24 h	Plasma
5	157	2	VO	1,5 mg/kg	5 ml/kg	30 min, 1 h, 2 h, 6 h 10 h, 24 h	Plasma

El compuesto 153 se preparó nuevo diluyendo los fármacos poco antes de su uso en bicarbonato de sodio al 4 % para inyección estéril (esta es la solución pediátrica patrón de NaHCO_3 con un pH de aproximadamente 8,5). Las concentraciones finales de las soluciones de 153 fueron de 0,25 mg/ml. Las soluciones de 153 se administraron por vía IV o VO a un volumen de dosis de 5 ml/kg de acuerdo con el último peso corporal. El compuesto 157 se preparó nuevo diluyendo los fármacos poco antes de su uso en bicarbonato de sodio al 4 % para inyección estéril (esta es la solución pediátrica patrón de NaHCO_3 con un pH de aproximadamente 8,5). Las concentraciones finales de las soluciones de 153 fueron de 0,3 mg/ml. Las soluciones de 157 se administraron por vía IV o VO a un volumen de dosis de 5 ml/kg de acuerdo con el último peso corporal.

Doce (12) ratas SD hembra por grupo fueron dosificadas por vía intravenosa con 153 o 157. Las ratas estuvieron en ayunas durante la noche antes de la dosificación, con libre acceso al agua. La comida fue retenida durante 2 horas después de la dosis. Se recogieron muestras de sangre, hígado y tejido cerebral de dos animales de cada grupo en cada punto de tiempo, más/menos un 10 % del tiempo programado para cada punto de tiempo. Se usaron dos animales más para el desarrollo del método analítico.

Se recogió sangre ($> 0,3$ ml) a través de la aorta abdominal en animales anestésicos en tubos que contenían heparina a los 15 min, y 1, 2, 6, 10 y 24 horas después de la administración IV. Se recogieron tejidos de hígado y cerebro inmediatamente después de la muerte del animal. Se extirparon tejidos hepáticos y cerebrales, y se enjuagaron con solución salina fría para evitar la sangre residual. Tras la extracción, se dispuso cada muestra en hielo, y posteriormente se centrifugaron las muestras de sangre (4 °C, 11000 rpm, 5 min) para separar el plasma. Se almacenaron las muestras de plasma, hígado y tejido cerebral a -70 °C hasta el análisis de LC-MS/MS.

Dos (2) ratas SD hembra por grupo fueron dosificadas por VO con 153 o 157. Las ratas estuvieron en ayunas durante la noche antes de la dosificación, con libre acceso al agua. La comida fue retenida durante 2 horas después de la dosis. Se recogieron muestras de sangre ($> 0,3$ ml) a través de la aorta abdominal en animales anestésicos en tubos que contenían heparina a los 30 min, y 1, 2, 6, 10 y 24 horas después de la administración VO.

Preparación de muestras de plasma, hígado y cerebro para el compuesto 153

Se descongelaron muestras de plasma desconocidas congeladas a temperatura ambiente y se agitaron bien con formación de vórtice. Con una pipeta, se transfirieron 50 μ l de plasma a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. A cada muestra, se añadieron 20 μ l de IS-D (para muestras en blanco, se añadieron 20 μ l de acetonitrilo:agua (1: 1)) y 300 μ l de acetonitrilo. Se agitó la mezcla de muestra con formación de vórtice durante aproximadamente 3 min. Despues de la centrifugación a 10000 rpm durante 5 min a 4 °C, se transfirieron 100 μ l de la capa superior a un tubo nuevo y se añadieron 200 μ l de ácido fórmico al 0,4 % en agua (pH 6,0). Se agitó la mezcla con formación de vórtice durante aproximadamente 3 min antes de inyectarse en el sistema de LC/MS/MS para su análisis.

El día del ensayo, se descongelaron las muestras congeladas de hígado y cerebro sin ayuda a temperatura ambiente. Se colocó una muestra pesada de aproximadamente 200 mg de cada tejido descongelado en un tubo de plástico con agua (0,6 ml) para facilitar la homogeneización. Se realizó el procesamiento de los tejidos usando un homogeneizador durante aproximadamente 1 min, se transfirieron 200 μ l de homogeneizado a un tubo Eppendorf nuevo. A cada tubo, se añadieron 50 μ l de IS-D y se mezclaron. Luego se añadieron 600 μ l de acetonitrilo, y se agitó la mezcla de muestra con formación de vórtice durante aproximadamente 3 min. Despues de la centrifugación a 10000 rpm durante 5 min a 4 °C, se transfirieron 400 μ l de la capa superior a un nuevo tubo y se evaporó el sobrenadante a sequedad a 35 °C. Se reconstituyó el residuo con 200 μ l de ácido fórmico al 0,4 % en agua (pH 6,0) y se agitó con formación de vórtice durante 3 min, se remitió para su análisis de LC-MS/MS.

Preparación de muestras de plasma, hígado y cerebro para el compuesto 157

Se descongelaron muestras de plasma desconocidas congeladas a temperatura ambiente y se agitaron bien con

formación de vórtice. Con una pipeta, se transfirieron 50 μ l de plasma a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. A cada muestra, se añadieron 30 μ l de IS-D (para muestras en blanco, se añadieron 20 μ l de acetonitrilo:agua (1: 1)) y 300 μ l de acetonitrilo. Se agitó la mezcla de muestra con formación de vórtice durante aproximadamente 3 min. Después de la centrifugación a 10000 rpm durante 5 min a 4 °C, se transfirieron 100 μ l de la capa superior a un tubo nuevo y se añadieron 200 μ l de ácido fórmico al 0,4 % en agua (pH 6,0). Se agitó la mezcla con formación de vórtice durante aproximadamente 3 min antes de inyectarse en el sistema de LC/MS/MS para su análisis.

5 El día del ensayo, se descongelaron las muestras congeladas de hígado y cerebro sin ayuda a temperatura ambiente. Se colocó una muestra pesada de aproximadamente 200 mg de cada tejido descongelado en un tubo de plástico con agua (0,6 ml) para facilitar la homogeneización. Se realizó el procesamiento de los tejidos usando un homogeneizador durante aproximadamente 1 min, se transfirieron 100 μ l de homogeneizado a un tubo Eppendorf nuevo. A cada tubo, se añadieron 50 μ l de IS-D y se mezclaron. Luego se añadieron 500 μ l de acetonitrilo, y se agitó la mezcla de muestra con formación de vórtice durante aproximadamente 3 min. Después de la centrifugación a 10000 rpm durante 5 min a 4 °C, se transfirieron 100 μ l de la capa superior a un nuevo tubo y se evaporó el sobrenadante a sequedad a 35 °C. 10 15 Se reconstituyó el residuo con 200 μ l de ácido fórmico al 0,4 % en agua (pH 6,0) y se agitó con formación de vórtice durante 3 min, se remitió para su análisis de LC-MS/MS.

Preparación de muestras de plasma, hígado y cerebro para el Endothal

20 25 30 Se descongelaron por completo muestras de plasma desconocidas congeladas a temperatura ambiente y se agitaron bien con formación de vórtice. Con una pipeta, se transfirieron 50 μ l de plasma a un tubo Eppendorf de 2,0 ml. Se añadieron 50 μ l de HCl 0,1 N y 800 μ l de acetato de etilo a cada muestra. Se agitó la mezcla de muestra con formación de vórtice durante aproximadamente 3 min. Después de la centrifugación a 10000 rpm durante 5 min a 4 °C, se transfirieron los 600 μ l de sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se extrajo el precipitado nuevamente con 800 μ l de acetato de etilo y se transfirieron 600 μ l de sobrenadante al mismo tubo, y se evaporó a sequedad. Se reconstituyó el residuo con 150 μ l de IS-D (para muestras en blanco, ácido fórmico al 0,05 % en acetonitrilo) y se agitó con formación de vórtice durante 3 min y se remitió para el análisis LC/MS/MS.

35 El día del ensayo, se descongelaron las muestras congeladas de tejidos de hígado y cerebro sin ayuda a temperatura ambiente. Se colocó una muestra pesada de aproximadamente 200 mg de cada tejido descongelado en un tubo de plástico con agua (0,6 ml) para facilitar la homogeneización. Se transfirieron 150 μ l de cada homogeneizado a un tubo Eppendorf nuevo, se añadieron 150 μ l de HCl 0,1 N y 800 μ l de éter acético a cada muestra de homogeneizado. Se agitó la mezcla de muestra con formación de vórtice y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min a 4 °C. Se transfirieron 600 μ l de sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1,5 ml, se extrajo el precipitado nuevamente con 800 μ l de acetato de etilo y se transfirieron 600 μ l de sobrenadante al mismo tubo, y se evaporó a sequedad. Se reconstituyó el residuo con 200 μ l de IS-D (para muestras en blanco, ácido fórmico al 0,05 % en acetonitrilo) y se agitó con formación de vórtice durante 3 min y se remitió para el análisis LC/MS/MS.

Preparación de muestras de calibración para el Compuesto 153

40 45 50 55 60 1) Preparación de muestras de calibración para el análisis de muestras de plasma

Se prepararon patrones de calibración añadiendo 25 μ l de las soluciones patrón de 153 a 25 μ l de plasma de rata en blanco heparinizado. Las concentraciones patrón nominales en plasma de ratón fueron 2,00, 4,00, 10,0, 50,0, 100, 500, 900 y 1000 ng/ml.

2) Preparación de muestras de calibración para análisis de muestras de tejido hepático y cerebral

Para cuantificar 153 en muestras de tejido hepático y cerebral, se preparó una curva de calibración que consistía en 8 muestras patrón, usando el mismo homogeneizado de tejido en blanco que la matriz de muestra analizada (concentraciones finales: 1,00, 2,00, 5,00, 25,0, 50,0, 250, 450 y 500 ng/g).

Preparación de muestras de calibración para el Compuesto 157

55 60 65 1) Preparación de muestras de calibración para el análisis de muestras de plasma

Se prepararon patrones de calibración añadiendo 25 μ l de las soluciones patrón de 157 a 25 μ l de plasma de rata en blanco heparinizado. Las concentraciones patrón nominales en plasma de ratón fueron 0,500, 1,00, 2,50, 12,5, 25,0, 125, 225 y 250 ng/ml.

2) Preparación de muestras de calibración para análisis de muestras de tejido hepático y cerebral

Para cuantificar 157 en muestras de tejido hepático y cerebral, se preparó una curva de calibración que consistía en 8 muestras patrón, usando el mismo homogeneizado de tejido en blanco que la matriz de muestra analizada (concentraciones finales: 0,500, 1,00, 2,50, 12,5, 25,0, 125, 225 y 250 ng/ml).

Preparación de muestras de calibración para el Endothal

1) Preparación de muestras de calibración para el análisis de muestras de plasma

5 Se prepararon patrones de calibración añadiendo 25 μ l de las soluciones patrón de Endothal a 25 μ l de plasma de rata en blanco heparinizado. Las concentraciones patrón nominales en plasma de rata fueron 20,0, 40,0, 100, 200, 400, 2000, 3600 y 4000 ng/ml.

2) Preparación de muestras de calibración para análisis de muestras de tejido hepático

10 Para cuantificar el Endothal en muestras de tejido hepático, se preparó una curva de calibración que consistía en 8 muestras patrón, usando el mismo homogeneizado de tejido en blanco que la matriz de muestra analizada (concentraciones finales: 20,0, 40,0, 100, 200, 400, 2000, 3600 y 4000 ng/g).

15 Sistema de LC/MS/MS

20 El análisis se realizó usando un sistema de LC-MS/MS que consistía en los siguientes componentes: Sistema de HPLC (Cromatografía de líquidos de alto rendimiento, *High Performance Liquid Chromatography*): Shimadzu UFC 20-AD XR; Sistema de MS/MS: espectrómetro de masas de triple cuadrupolo API-5000 (Applied Biosystems); Sistema de datos: Watson LIMS versión 7.2.

1) Condiciones cromatográficas para el Compuesto 153

Columna analítica:	Luna C18 5 μ m, 50 x 2,0 mm						
Fase móvil:	A: Ácido fórmico al 0,4 % en agua (pH 6,0) B: Acetonitrilo						
Volumen de inyección:	20~30 μ l						
Tiempo de ejecución:	~ 4,5 min						
Caudal:	0,5 ml/min						

Tiempo	0	0,5	0,6	2,0	2,1	3,0	3,1	4,5
% de B	15	15	45	45	95	95	15	Parada
Posición de la válvula de desvío	Residuos	MS	MS	MS	MS	Residuos		Residuos

25

2) Condiciones de espectrometría de masas para el Compuesto 153

Parámetros	153		
Pulverización de iones (IS, <i>Ion Spray</i>)	5000 V		
Gas de cortina (CUR, <i>CURTain</i>)	15		
Temperatura (TEM)	500 °C		
Potencial de entrada (EP, <i>Entrance Potential</i>)	10		
Gas de colisión (CAD, <i>Collisionally Activated Dissociation</i>)	6		
Potencial de salida de celda de colisión (CXP, <i>Collision cell eXit Potential</i>)	15		
Tiempo de permanencia (ms)	100		
Gas 1	40		
Gas 2	40		
Potencial de desagregación (DP, <i>Declustering Potential</i>)	120		
Modo de ionización:	(+)		

(CE):

Compuesto	Ion precursor (<i>m/z</i>)	Ion producto (<i>m/z</i>)	CE (eV)
153	311,1	169,2	30
Irbesartán (IS)	429,4	207,2	30

30 1) Condiciones cromatográficas para el Compuesto 157

Columna analítica:	Luna C18 5 μ m, 50 x 2,0 mm		
Fase móvil:	A: Ácido fórmico al 0,4 % en agua (pH 6,0) B: Acetonitrilo		
Volumen de inyección:	10 μ l		
Tiempo de ejecución:	~4,5 min		
Caudal:	0,5 ml/min		

ES 2 795 950 T3

Tiempo	0	0,5	2,0	2,1	3,0	3,1	4,0
% de B	45	45	45	95	95	45	Parada
Posición de la válvula de desvío	Residuos	MS	MS	MS	Residuos		Residuos

2) Condiciones de espectrometría de masas para el Compuesto 157

5

Parámetros	157
Pulverización de iones (IS)	5000 V
Gas de cortina (CUR)	15
Temperatura (TEM)	450 °C
Potencial de entrada (EP)	10
Gas de colisión (CAD)	6
Potencial de salida de celda de colisión (CXP)	15
Tiempo de permanencia (ms)	100
Gas 1	40
Gas 2	40
Potencial de desagregación (DP)	120
Modo de ionización:	(+) ESI

(CE):

Compuesto	Ion precursor (<i>m/z</i>)	Ion producto (<i>m/z</i>)	CE (eV)
157	367,3	251,0	25
Verapamil (IS)	455,1	303,3	25

1) Condiciones cromatográficas para el Endothal

La separación cromatográfica se llevó a cabo a temperatura ambiente.

10

Columna analítica:	Luna HILIC 5 µm, 100 x 2,0 mm
Fase móvil:	A: Ácido fórmico al 0,1 % en agua B: Acetonitrilo
Volumen de inyección:	5 µl
Tiempo de ejecución:	~ 2,5 min
Caudal:	0,6 ml/min

Tiempo	0	0,4	2,0	2,5
% de B	88	88	88	Parada
Posición de la válvula de desvío	Residuos	MS	Residuos	Residuos

2) Condiciones de espectrometría de masas para el Endothal

Parámetros	Endothal
Pulverización de iones (IS)	-4500V
Gas de cortina (CUR)	20
Temperatura (TEM)	450 °C
Potencial de entrada (EP)	-10
Gas de colisión (CAD)	6
Potencial de salida de celda de colisión (CXP)	-10
Tiempo de permanencia (ms)	150
Gas 1	45
Gas 2	45
Potencial de desagregación (DP)	-80
Modo de ionización:	(-) ESI

15

(CE):

Compuesto	Ion precursor (<i>m/z</i>)	Ion producto (<i>m/z</i>)	CE (eV)
Endothal	185	141	-30
PAH(IS)	192,9	149	-20

Cuantificación

La cuantificación se realizó mediante el método convencional externo para 153, 157 y Endothal. Las concentraciones del artículo de prueba se calcularon usando una regresión lineal de mínimos cuadrados ponderada ($W = 1/x^2$).

Interpretación farmacocinética

Los parámetros farmacocinéticos se evaluaron usando Watson LIMS (versión 7.2), suponiendo un modelo no compartimental para la absorción y distribución del fármaco.

- AUC_{0-t} ($AUC_{último}$) es el área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo desde el punto de tiempo cero hasta el último tiempo de muestreo, calculada mediante la regla trapezoidal lineal.
- $AUC_{0-\infty}$ (AUC_{INF}) es el área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo con la última concentración extrapolada basada en la constante de la tasa de eliminación.

Resultados

La curva de calibración de 153 en plasma de rata fue lineal durante todo el estudio en el intervalo de 2,00-1000 ng/ml. La ecuación lineal y el coeficiente de correlación de la curva de calibración son $y = 0,0252x + 0,0127$ y $R^2 = 0,9957$.

La curva de calibración de 100 en los tejidos probados fue lineal durante todo el estudio en el intervalo de 1,00-500 ng/g. La ecuación lineal y el coeficiente de correlación de la curva de calibración es $y = 0,0233x + 0,0213$ y $R^2 = 0,9939$.

La curva de calibración de 157 en plasma de rata fue lineal durante todo el estudio en el intervalo de 0,50-250 ng/ml. La ecuación lineal y el coeficiente de correlación de la curva de calibración es $y = 0,333x - 0,0136$ y $R^2 = 0,9986$.

La curva de calibración de 157 en los tejidos probados fue lineal durante todo el estudio en el intervalo de 0,50-250 ng/g. La ecuación lineal y el coeficiente de correlación de la curva de calibración es $y = 0,0467x + 0,0034$ y $R^2 = 0,9989$.

Las curvas de calibración de Endothal en el plasma de rata fueron lineales durante todo el estudio en el intervalo de 20,0-4000 ng/ml. La ecuación lineal y el coeficiente de correlación de la curva de calibración es $y = 0,00155x - 0,00162$ y $R^2 = 0,9986$.

Las curvas de calibración de Endothal en los tejidos hepáticos de rata fueron lineales durante todo el estudio en el intervalo de 20,0-4000 ng/g. La ecuación lineal y el coeficiente de correlación de la curva de calibración son $y = 0,00349x + 0,0177$ y $R^2 = 0,997$.

Tras la administración única IV y VO de 153 a ratas SD, Las concentraciones en plasma, hígado y tejido cerebral tanto de 153 como de Endothal se determinaron mediante el método de LC/MS/MS descrito anteriormente. Las concentraciones en plasma, hígado y tejido cerebral en cada tiempo de muestreo se enumeran en las Tablas 6.1-6.8 y en las Figuras 1A-1B. Los parámetros farmacocinéticos calculados se enumeran en la Tabla 6.9-6.12.

153 estaba disponible por vía oral a 1,25 mg/kg para ratas SD, el valor de $C_{máx}$ fue de 239 ng/ml, El valor de AUC fue de 164 ng.h/ml, y el BA fue del 55,41 %.

El valor medio de $C_{máx}$ en plasma fue de 557 ng/ml tras la administración IV de 153. Los valores medios de $C_{máx}$ en hígado y cerebro fueron de 762,0 ng/kg y 42,7 ng/kg, respectivamente. El valor de $AUC_{último}$ en plasma fue de 295 ng.h/ml, con 500 ng.h/g en hígado y 39,4 ng.h/g en cerebro, respectivamente. Los valores de $T_{1/2}$ en plasma, hígado y cerebro fueron de 0,921 h, 0,626 h y 0,596 h, respectivamente.

Como se muestra en la Tabla 6.5-6.8 y en la Figura 1B, el Endothal fue detectable en muestras de plasma e hígado tras una sola administración IV de 153 a 1,25 mg/kg, mientras que no fue detectable en muestras de cerebro. Los valores medios de $C_{máx}$ en plasma e hígado fueron de 70,5 ng/ml y 2068 ng/ml, respectivamente. Los valores de $AUC_{último}$ en plasma e hígado fueron de 378 ng.h/ml y 10820 ng.h/g, respectivamente. Los valores de $T_{1/2}$ en plasma e hígado fueron de 5,20 h y 2,79 h, respectivamente.

Tras la administración única IV y VO de 157 a ratas SD, Las concentraciones en plasma, hígado y tejido cerebral tanto

de 157 como de Endothal se determinaron mediante el método de LC/MS/MS descrito anteriormente. Las concentraciones en plasma, hígado y tejido cerebral en cada tiempo de muestreo se enumeran en las Tablas 6.13-6.20 y en la Figura 1C-1D. Los parámetros farmacocinéticos calculados se enumeran en la Tabla 6.21-6.24. 157 estaba poco disponible por vía oral a 1,5 mg/kg para ratas SD, el valor de $C_{máx}$ fue de 6,14ng/ml, El valor de AUC fue de 3,2 ng.h/ml, y el BA fue del 6,98 %.

5 El valor medio de $C_{máx}$ en plasma fue de 115 ng/ml tras la administración IV de 157 a 1,5 mg/kg a ratas SD. Los valores medios de $C_{máx}$ en hígado y cerebro fueron de 297 ng/kg y 60,0 ng/kg, respectivamente. El AUC_{último} en plasma fue de 47,2 ng.h/ml, con 152 ng.h/g en hígado y 24,6 ng.h/g en cerebro, respectivamente. Los valores de $T_{1/2}$ en plasma, 10 hígado y cerebro fueron de 0,391 h, 0,813 h y 0,162 h, respectivamente.

10 Como se muestra en la Tabla 6.17-6.20 y en la Figura 1D, el Endothal fue detectable en muestras de plasma e hígado tras una sola administración IV de 157 a 1,5 mg/kg, mientras que el Endothal no fue detectable en muestras de cerebro. Los valores medios de $C_{máx}$ en plasma e hígado fueron de 98,1ng/ml y 3720 ng/ml, respectivamente. Los valores de 15 AUC_{último} en plasma e hígado fueron de 374 ng.h/ml y 15025 ng.h/g, respectivamente. Los valores de $T_{1/2}$ en plasma e hígado fueron de 5,94 h y 2,61 h, respectivamente.

15 20 153 estaba disponible por vía oral a 1,25 mg/kg para ratas SD, el valor de $C_{máx}$ fue de 239 ng/ml, El valor de AUC fue de 164 ng.h/ml, y el BA fue del 55,41 %. El valor medio de $C_{máx}$ en plasma fue de 557 ng/ml tras la administración IV de 153. Los valores medios de $C_{máx}$ en hígado y cerebro fueron de 762,0 ng/kg y 42,7 ng/kg, respectivamente. El valor de AUC_{último} en plasma fue de 295 ng.h/ml, con 500 ng.h/g en hígado y 39,4 ng.h/g en cerebro, respectivamente. Los valores de $T_{1/2}$ en plasma, 25 hígado y cerebro fueron de 0,921 h, 0,626 h y 0,596 h, respectivamente.

25 El Endothal fue detectable en muestras de plasma e hígado tras una sola administración IV de 153 a 1,25 mg/kg. Los valores medios de $C_{máx}$ en plasma e hígado fueron de 70,5ng/ml y 2068 ng/ml, respectivamente. Los valores de AUC_{último} en plasma e hígado fueron de 378 ng.h/ml y 10820 ng.h/g, respectivamente. Los valores de $T_{1/2}$ en plasma e hígado fueron de 5,20 h y 2,79 h, respectivamente. Sin embargo, el Endothal no fue detectable en tejido cerebral.

30 35 157 estaba poco disponible por vía oral a 1,5 mg/kg para ratas SD, el valor de $C_{máx}$ fue de 6,14ng/ml, El valor de AUC fue de 3,2 ng.h/ml, y el BA fue del 6,98 %.

35 El valor medio de $C_{máx}$ en plasma fue de 115 ng/ml tras la administración IV de 157 a 1,5 mg/kg a ratas SD. Los valores medios de $C_{máx}$ en hígado y cerebro fueron de 297 ng/kg y 60,0 ng/kg, respectivamente. El valor de AUC_{último} en plasma fue de 47,2 ng.h/ml, con 152 ng.h/g en hígado y 24,6 ng.h/g en cerebro, respectivamente. Los valores de $T_{1/2}$ en plasma, hígado y cerebro fueron de 0,391 h, 0,813 h y 0,162 h, respectivamente.

40 El Endothal fue detectable en muestras de plasma e hígado tras una sola administración IV de 157 a 1,5 mg/kg. Los valores medios de $C_{máx}$ en plasma e hígado fueron de 98,1ng/ml y 3720 ng/ml, respectivamente. Los valores de AUC_{último} en plasma e hígado fueron de 374 ng.h/ml y 15025 ng.h/g, respectivamente. Los valores de $T_{1/2}$ en plasma e hígado fueron de 5,94 h y 2,61 h, respectivamente. Sin embargo, el Endothal no fue detectable en tejido cerebral.

Tabla 6.1: Datos analíticos de la concentración de 153 en plasma (ng/ml) en ratas SD después de la administración VO.

1,25 mg/kg Concentración en hígado (ng/g)				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	872	652	762	155,6
1	131	121	126	7,1
2	42	41,2	41,6	0,6
6	BLQ	BLQ	NA	NA
10	BLQ	ND	NA	NA
24	ND	ND	NA	NA

45

Tabla 6.2: Datos analíticos de la concentración de 153 en plasma (ng/ml) en ratas SD después de la administración IV.

1,25 mg/kg		Concentración en plasma (ng/ml)		
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	563	550	557	9,2
1	58	51,4	54,7	4,7
2	14,8	13	13,9	1,3
6	1,04	1,02	1,03	0
10	ND	9,42*	NA	NA
24	ND	ND	NA	NA

* La conc. fue de 9,42 ng/ml, lo que fue anómalo, y no se incluyó en el cálculo.

- 5 Tabla 6.3: Datos analíticos de la concentración de 153 en hígado (ng/g) en ratas SD después de la administración IV.

1,25 mg/kg		Concentración en hígado (ng/g)		
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	872	652	762	155,6
1	131	121	126	7,1
2	42	41,2	41,6	0,6
6	BLQ	BLQ	NA	NA
10	BLQ	ND	NA	NA
24	ND	ND	NA	NA

- 10 Tabla 6.4: Datos analíticos de la concentración de 153 en cerebro (ng/g) en ratas SD después de la administración IV.

1,25 mg/kg		Concentración en cerebro (ng/g)		
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	45	40,3	42,7	3,3
1	13,9	14,3	14,1	0,3
2	4,05	4,75	4,4	0,5
6	ND	ND	NA	NA
10	ND	ND	NA	NA
24	ND	ND	NA	NA

- 15 Tabla 6.5: Datos analíticos de la concentración de Endothal en plasma (ng/ml) en ratas SD después de la administración VO de 153.

Concentración de Endothal en plasma (ng/ml)				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	41,4	40,2	40,8	0,8
1	53,6	38,9	46,3	10,4
2	34,5	35,3	34,9	0,6
6	25,8	20,8	23,3	3,5
10	BLQ	ND	NA	NA
24	ND	ND	NA	NA

- 20 Tabla 6.6: Datos analíticos de la concentración de Endothal en plasma (ng/ml) en ratas SD después de la administración IV de 153.

Concentración de Endothal en plasma (ng/ml)				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	70,9	63,8	67,4	5
1	57,1	44,3	50,7	9,1
2	77,1	56,1	66,6	14,8
6	42,2	35,4	38,8	4,8
10	21,7	BLQ	NA	NA
24	BLQ	BLQ	NA	NA

5 **Tabla 6.7: Datos analíticos de la concentración de Endothal en hígado (ng/ml) en ratas SD después de la administración IV de 153.**

Concentración de Endothal en hígado (ng/g)				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	1524	956	1240	401,6
1	1836	2012	1924	124,5
2	1912	2224	2068	220,6
6	492	980	736	345,1
10	301	256	279	31,8
24	ND	ND	NA	NA

10 **Tabla 6.8: Datos analíticos de la concentración de Endothal en cerebro (ng/ml) en ratas SD después de la administración IV de 153.**

Concentración de Endothal en cerebro (ng/g)				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	ND	ND	NA	NA
1	ND	ND	NA	NA
2	ND	ND	NA	NA
6	ND	ND	NA	NA
10	ND	ND	NA	NA
24	ND	ND	NA	NA

15 **Tabla 6.9: Parámetros farmacocinéticos principales de 153 en ratas SD después de la administración IV o VO.**

Dosificación	Plasma	C _{máx}	T _{máx}	AUC	AUC _{0-∞}	MRT (tiempo medio de permanencia, <i>Mean Residence Time</i>) (0-t)	T _{1/2}	F
	Parámetros PK	ng/ml	Horas	ng*horas/ml	ng*horas/ml	Horas	Horas	%
1,25 mg/kg (Grupo de VO)	1	249	0,5	163	163	0,987	0,33	
	2	229	0,5	164	164	1,04	0,355	
	Media	239	0,5	164	164	1,01	0,343	55,41
1,25 mg/kg (Grupo de IV)	1	563	0,25	303	303	0,666	0,907	
	2	550	0,25	288	288	0,647	0,934	
	Media	557	0,25	295	296	0,657	0,921	

20 **Tabla 6.10: Parámetros farmacocinéticos principales de 153 en hígado y cerebro de ratas SD después de la administración IV o VO.**

TA	Dosificación	Grupo	Plasma	C _{máx}	T _{máx}	AUC	AUC _{0-∞}	MRT (0-t)	T _{1/2}
			Parámetros PK	ng/ml	Horas	ng*horas/ml	ng*horas/ml	Horas	Horas
Fin.	153	VO	1	53,6	1	189	395	2,8	5,53
			2	40,2	0,5	169	333	2,72	5,45
			Media	46,9	0,75	179	364	2,76	5,49
	1,25 mg/kg	IV	1	77,1	2	482	618	3,93	4,37
			2	63,8	0,25	274	581	2,74	6,02
			Media	70,5	1,13	378	600	3,34	5,2

26 **Tabla 6.11: Parámetros farmacocinéticos principales de Endothal en ratas SD después de una sola administración IV o VO de 153.**

Grupo	Parámetros PK	C _{máx}	T _{máx}	AUC	AUC _{0-∞}	MRT (0-t)	T _{1/2}
		ng/ml	Horas	ng*horas/ml	ng*horas/ml	Horas	Horas
Hígado	1	872	0,25	547	547	0,745	0,609
1,25 mg/kg	2	652	0,25	453	453	0,825	0,643
IV	Media	762	0,25	500	500	0,785	0,626
Cerebro	1	45	0,25	39,2	39,2	0,934	0,562
1,25 mg/kg	2	40,3	0,25	39,5	39,5	1,01	0,629
IV	Media	42,7	0,25	39,4	39,35	0,972	0,596

Tabla 6.12: Parámetros farmacocinéticos principales de Endothal en hígado y cerebro de ratas SD después de una sola administración IV de 153.

5

TA	Dosificación	Parámetros PK	C _{máx}	T _{máx}	AUC	AUC _{0-∞}	MRT (0-t)	T _{1/2}
			ng/ml	Horas	ng*horas/ml	ng*h/ml	Horas	Horas
Fin.	153	1	1912	2	9528	10800	3,05	3
	1,25 mg/kg	2	2224	2	12112	13100	3,43	2,57
	(Grupo de hígado)	Media	2068	2	10820	11950	3,24	2,79
	153	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	1,25 mg/kg	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	(Grupo de cerebro)	Media	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Tabla 6.13: Datos analíticos de la concentración de 157 en plasma (ng/ml) en ratas SD después de la administración VO.

10

1,5 mg/kg Concentración en plasma (ng/ml)				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,5	5,92	6,35	6,14	0,3
1	1,48	1,26	1,37	0,2
2	0,303	0,194	0,249	0,1
6	ND	ND	NA	NA
10	ND	ND	NA	NA
24	ND	ND	NA	NA

Tabla 6.14: Datos analíticos de la concentración de 157 en plasma (ng/ml) en ratas SD después de la administración IV.

15

1,5 mg/kg Concentración en plasma (ng/ml)				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	116	114	115	1,4
1	2,67	3,57	3,12	0,6
2	0,491	0,556	0,524	0
6	ND	ND	NA	NA
10	ND	ND	NA	NA
24	ND	ND	NA	NA

Tabla 6.15: Datos analíticos de la concentración de 157 en hígado (ng/g) en ratas SD después de la administración IV.

5

1,5 mg/kg Concentración en hígado (ng/g)				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	337	257	297	56,6
1	29,4	17,6	23,5	8,3
2	6,40	9,72	8,06	2,3
6	ND	ND	NA	NA
10	ND	BLQ	NA	NA
24	ND	ND	NA	NA

Tabla 6.16: Datos analíticos de la concentración de 157 en cerebro (ng/g) en ratas SD después de la administración IV.

10

1,5 mg/kg Concentración en cerebro (ng/g)				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	60,0	60,0	60,0	0,0
1	1,99	2,80	2,40	0,6
2	BLQ	BLQ	NA	NA
6	ND	ND	NA	NA
10	ND	ND	NA	NA
24	ND	ND	NA	NA

Tabla 6.17: Datos analíticos de la concentración de Endothal en plasma (ng/ml) en ratas SD después de la administración VO de 157.

15

Concentración de Endothal en plasma (ng/ml)				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	93,5	65,4	79,5	19,9
1	91,8	150	121	41,2
2	142	68,9	105	51,7
6	22,7	31,9	27,3	6,5
10	BLQ	BLQ	NA	NA
24	ND	ND	NA	NA

Tabla 6.18: Datos analíticos de la concentración de Endothal en plasma (ng/ml) en ratas SD después de la

administración IV de 157.

Concentración de Endothal en plasma (ng/ml)				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	76,4	53,4	64,9	16,3
1	113	83,2	98,1	21,1
2	91,5	45,7	68,6	32,4
6	47,7	45	46,4	1,9
10	BLQ	BLQ	NA	NA
24	BLQ	BLQ	NA	NA

- 5 **Tabla 6.19: Datos analíticos de la concentración de Endothal en hígado (ng/ml) en ratas SD después de la administración IV de 157.**

Concentración de Endothal en hígado (ng/g)				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	3676	3536	3606	99,0
1	3124	3764	3444	452,5
2	2484	2272	2378	149,9
6	1000	1076	1038	53,7
10	218	344	281	89,1
24	ND	ND	NA	NA

- 10 **Tabla 6.20: Datos analíticos de la concentración de Endothal en cerebro (ng/ml) en ratas SD después de la administración IV de 157.**

Concentración de Endothal en cerebro (ng/g)				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	ND	ND	NA	NA
1	ND	ND	NA	NA
2	ND	ND	NA	NA
6	ND	ND	NA	NA
10	ND	ND	NA	NA
24	ND	ND	NA	NA

- 15 **Tabla 6.21: Parámetros farmacocinéticos principales de 157 en ratas SD después de la administración IV o VO.**

Dosificación	Grupo	Plasma	C _{máx}	T _{máx}	AUC		AUC _{0-∞}	MRT (0-t)	T _{1/2}	F
		Parámetros PK	ng/ml	Horas	ng*horas/ml	ng*horas/ml	Horas	Horas	%	
1,5 mg/kg	VO	1	5,92	0,5	3,4	3,4	0,988	0,437		
		2	6,35	0,5	3	3	0,903	0,37		
		Media	6,14	0,5	3,2	3,2	0,946	0,404	6,78	
	IV	1	116	0,25	47,1	47,1	0,333	0,409		
		2	114	0,25	47,3	47,3	0,349	0,373		
		Media	115	0,25	47,2	47,2	0,341	0,391		

Tabla 6.22: Parámetros farmacocinéticos principales de 157 en hígado y cerebro de ratas SD después de la administración IV.

Dosificación	Tejidos	Parámetros PK	C _{máx}	T _{máx}	AUC	AUC _{0-∞}	MRT (0-t)	T _{1/2}
			ng/ml	Horas	ng*horas/ml	ng*horas/ml	Horas	Horas
1,5 mg/kg	Hígado	1	337	0,25	168	168	0,531	0,455
		2	257	0,25	136	136	0,647	1,17
		Media	297	0,25	152	152	0,589	0,813
	Cerebro	1	60	0,25	24,2	24,2	0,305	0,153
		2	60	0,25	25	25	0,323	0,17
		Media	60	0,25	24,6	24,6	0,314	0,162

5

Tabla 6.23: Parámetros farmacocinéticos principales de Endothal en ratas SD tras una sola administración IV y VO de 157.

TA	Dosificación	Grupo	Plasma	C _{máx}	T _{máx}	AUC	AUC _{0-∞}	MRT (0-t)	T _{1/2}
			Parámetros PK	ng/ml	Horas	ng*horas/ml	ng*horas/ml	Horas	Horas
Endothal	157 (1,25 mg/kg)	VO	1	142	2	492,6	542	2,15	1,51
			2	150	1	365	481	2,32	2,51
			Media	146	1,5	429	512	2,24	2,01
	157 (1,25 mg/kg)	IV	1	113	1	452	733	2,52	4,08
			2	83,2	1	297	803	2,85	7,8
			Media	98,1	1	374	768	2,69	5,94

10

Tabla 6.24: Parámetros farmacocinéticos principales de Endothal en hígado y cerebro de ratas SD después de una sola administración IV de 157.

TA	Dosisificación	Tejidos	Parámetros PK	C _{máx}	T _{máx}	AUC	AUC _{0-∞}	MRT (0-t)	T _{1/2}
				ng/ml	Horas	ng*horas/ml	ng*horas/ml	Horas	Horas
Endothal	157 (1,25 mg/kg IV)	Hígado	1	3676	0,25	14759	15500	2,97	2,28
			2	3764	1	15292	16700	3,12	2,94
			Media	3720	0,625	15025	16100	3,05	2,61
	Cerebro	Cerebro	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			Media	NA	NA	NA	NA	NA	NA

15

Ejemplo 2. Estudio farmacocinético del Compuesto 105

El fin de este estudio era determinar los parámetros farmacocinéticos de 105 y de Endothal en plasma e hígado tras una sola administración intravenosa de 105 a ratas SD macho. Se disolvió 105 en NaHCO₃ al 4 % en solución salina para administración IV. El procedimiento detallado de preparación de la solución de dosificación se presentó en el Apéndice I.

Fuente de los animales:

Especie	Género	Proveedor	N.º de certificado
Ratas SD	Macho	SLAC Laboratory Animal Co. LTD	SCXK (SH) 2007-0005

- 5 Se sometieron al estudio trece (13) animales. Los animales del grupo IV tuvieron libre acceso a comida y agua. Se usó un animal adicional para la generación de hígado y plasma en blanco (5 ml por animal). El hígado y el plasma en blanco resultantes se aplicaron luego al desarrollo del método bioanalítico y al bioanálisis de las muestras para todo el estudio.

Diseño del estudio en vida

Tratamiento Grupo	Peso corporal (g)	N.º de animales	Vía de administración	Dosis	Dosis	Dosis	Puntos de tiempo	
				Nivel*	Conc.	Volumen		
				(mg/kg)	(mg/ml)	(ml/kg)		
10	1	220-255	12	IV	1	1	1	Muestreo a las 0,25, 1, 2, 6, 10 y 24 horas después de la dosis. Finalmente, se extraen muestras de plasma e hígado del mismo animal.

10 *La dosis se expresó como base libre de 105.

Dosificación, muestreo, procesamiento de muestras y almacenamiento de muestras

- 15 La inyección IV se realizó a través de la vena dorsal del pie. Los animales tenían libre acceso a la comida y al agua antes de la dosis.
- 20 El animal se retiene manualmente. Se extraen aproximadamente 150 µl de sangre/punto de tiempo en un tubo de heparina de sodio a través de una punción cardíaca para el sangrado terminal (con anestesia de dióxido de carbono). La muestra de sangre se pondrá en hielo y se centrifugará, obteniéndose una muestra de plasma (2000 g, 5 min por debajo de 4 °C) en 10 minutos.
- 25 El animal será sacrificado mediante inhalación de dióxido de carbono. Se abre la cavidad abdominal con unas tijeras para dejar al descubierto los órganos internos. Se sujetan la carcasa en posición vertical y se permite que los órganos caigan hacia adelante. Se cortan los tejidos conjuntivos y se extraen los órganos. Luego, se enjuagan los órganos con solución salina fría, se secan sobre papel de filtro, se colocan en un tubo con tapa de rosca y se pesan, se congelan rápidamente, colocándolos en hielo seco de inmediato.
- 30 Las muestras de plasma e hígado se almacenaron a aproximadamente -80 °C hasta el análisis. Las muestras de soporte se desecharán tres semanas después de la finalización de la vida a menos que se solicite. Las soluciones de dosificación no usadas se desecharán en el transcurso de las tres semanas posteriores a la finalización del estudio.

Método analítico del análisis LC-MS-MS para 105

Instrumento	UPLC/MS-MS-010 (API-4000)
Matriz	Plasma y homogeneizado hepático de rata SD
Analito(S)	Compuesto 105
Patrón(es) interno(s)	Dexametasona
Condiciones de MS	ESI: Ión positivo
	Detección MRM
	LB-105: $[M+H]^+ m/z 283,3 \rightarrow 265,2$
	Dexametasona: $[M+H]^+ m/z 393,3 @ 373,1$
Condiciones de HPLC	Fase móvil A: H_2O-FA al 0,1 %- NH_4OAc 5 mM
	Fase móvil B: ACN
	Tiempo (min) Fase móvil B (%)
	0,20 2,00
	1,00 95,0
	1,60 95,0
	1,61 2,00
	2,20 parada
	Columna: ACQUITY UPLC HSS T3 (2,1 x 50 m, 1,8 μ m)
	Caudal: 0,60 ml/min
	Temperatura de la columna: 60 °C
	Tiempo de retención:
	LB-105: 0,97 min
	Dexametasona: 1,25 min
	Para las muestras de plasma: Se añadió una alícuota de muestra de 30 μ l con 100 μ l de IS (dexametasona, 100 ng/ml en ACN). Se agitó la mezcla con formación de vórtice durante 10 min a 750 rpm y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. Se inyectó una alícuota de sobrenadante de 3 μ l para el análisis de LC-MS/MS.
	Para las muestras diluidas: Se diluyó una alícuota de muestra de plasma de 3 μ l con 27 μ l de plasma en blanco. El siguiente procedimiento de procesamiento fue el mismo que las muestras de plasma sin diluir.
	Para la preparación de todas las muestras, se deja descongelar la calibración, el control de calidad, los blancos y las muestras de prueba a 4 °C (nominal). Y cada etapa se mantiene en un baño de hielo o a 4 °C.
Curva de calibración	10,00-3000 ng/ml para LB-105 en plasma y homogeneizado hepático de rata SD.

Método analítico del análisis LC-MS-MS para el Endothal

Instrumento	UPLC/MS-MS-015 (API-5500, Q-trap)
Matriz	Plasma y homogeneizado hepático de rata SD
Analito(S)	Endothal
Patrón(es) interno(s)	Diclofenaco
Condiciones de MS	ESI: Ión negativo
Condiciones de HPLC	Detección MRM
	Endothal: [M-H] ⁻ m/z 184,9 → 141,0
	Diclofenaco: [M-H] ⁻ m/z 294,2 → 249,9
	Fase móvil A: H ₂ O-FA al 0,1 %-NH ₄ OAc 5 mM
	Fase móvil B: ACN
	Tiempo (min) Fase móvil B (%)
	0,40 2,00
	1,00 85,0
	1,50 85,0
	1,51 2,00
	2,00 parada
	Columna: ACQUITY UPLC HSS T3 (2,1 x 50 mm, 1,8 µm)
	Caudal: 0,60 ml/min
	Temperatura de la columna: 60 °C
	Tiempo de retención:
	Endothal: 0,87 min
	Diclofenaco: 1,28 min
	Para las muestras de plasma:
	Se añadió una alícuota de muestra de 30 µl con 100 µl de IS (Diclofenaco, 100 ng/ml en ACN). Se agitó la mezcla con formación de vórtice durante 10 min a 750 rpm y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. Se inyectó una alícuota de sobrenadante de 3 µl para el análisis de LC-MS/MS.
	Para las muestras de homogeneizado de hígado:
	Se homogeneizaron las muestras de hígado con 3 volúmenes (v/p) de solución de homogeneización de PBS (pH 7,4) durante 2 min. Se añadió una alícuota de muestra de homogeneizado tisular de 30 µl con 100 µl de IS (Diclofenaco, 100 ng/ml en ACN). Se agitó con formación de vórtice a 750 rpm durante 10 min y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. Se inyectó una alícuota de sobrenadante de 3 µl para el análisis de LC-MS/MS.
	Para la preparación de todas las muestras, se deja descongelar la calibración, el control de calidad, los blancos y las muestras de prueba a 4 °C (nominal). Y cada etapa se mantiene en un baño de hielo o a 4 °C.
Curva de calibración	20,00-3000 ng/ml para Endothal en plasma y homogeneizado hepático de rata SD.

Análisis farmacocinético

Software: Los parámetros PK fueron determinados por el modelo no compartimental de la herramienta de análisis no compartimental, Software Pharsight Phoenix WinNonlin® 6.2.

5 Regla "BQL": Los datos de concentración por debajo del 80 % del LLOQ (LLOQ = 10,00 ng/ml en plasma y homogeneizado hepático de rata para 105, y 20,00 ng/ml para Endothal) se reemplazaron con el "BQL" y se excluyeron de los gráficos y de la estimación de los parámetros PK. Los datos de concentración dentro del 80 %-120 % del LLOQ se consideraron dentro de la variación instrumental normal y se presentaron en los resultados.

10 Cálculo de $t_{1/2}$ terminal: Los puntos de tiempo se seleccionaron automáticamente mediante el modelo de "mejor ajuste" para la estimación de la semivida terminal como la primera opción. La selección manual se aplicó cuando el "mejor ajuste" no pudo definir bien la fase terminal.

15 Observaciones clínicas

Los datos de concentración-tiempo y los parámetros farmacocinéticos de 105 y Endothal en plasma e hígado de rata tras la administración IV se enumeraron en las Tablas 7.1 a 7.8, y se ilustraron en las Figuras 2A a 2C.

20 **Tabla 7.1: Datos de concentración media e individual en plasma-tiempo de 105 tras una dosis IV de 1 mg/kg en ratas SD macho**

Tiempo (h)	Individual	Media (ng/ ml)
0,25	1930	1530
1	263	228
2	45,2	21,5
6	BQL	BQL
10	BQL	BQL
24	BQL	BQL

25 El LLOQ (Límite inferior de cuantificación, *Lower Limit of Quantification*) de 105 en muestra de plasma es de 10,0 ng/ml.

El ULOQ (Límite superior de cuantificación, *Upper Limit of Quantification*) de 105 en muestra de plasma es de 3000 ng/ml.

BLQ: Por debajo del límite de cuantificación

30 **Tabla 7.2: Datos de concentración media e individual en hígado-tiempo de 105 tras una dosis IV de 1 mg/kg en ratas SD macho**

Tiempo (h)	Individual	Media (ng/g)
0,25	1070	988
1	576	446
2	99,2	131
6	BQL	BQL
10	BQL	BQL
24	BQL	BQL

La muestra de hígado se homogeneizó con 3 volúmenes (v/p) de solución de homogeneización (PBS a pH 7,4).

Concentración en hígado = Conc. en el homogeneizado hepático x 4, suponiendo que 1 g de tejido de hígado húmedo equivale a 1 ml.

El LLOQ de 105 en la muestra de homogeneizado hepático es de 10,0 ng/ml.

El ULOQ de 105 en muestra de homogeneizado hepático es de 3000 ng/ml.

BLQ: Por debajo del límite de cuantificación

35 **Tabla 7.3: Proporción de concentración en hígado con respecto a la concentración en plasma de 105 tras una dosis IV de 1 mg/kg en ratas SD macho**

Tiempo (h)	Individual	Media
0,25	0,554	0,646
1	2,19	1,96
2	2,19	6,09
6	NA	NA
10	NA	NA
24	NA	NA

NA: No applicable

Tabla 7.4: Datos de concentración media e individual en plasma-tiempo de Endothal tras una dosis IV de 105 a 1 mg/kg en ratas SD

5

Tiempo (h)	Individual	Media (ng/ ml)
0,25	263	188
1	69,7	45,2
2	23,2	BQL
6	BQL	BQL
10	BQL	21,9
24	BQL	BQL

El LLOQ del Endothal en muestra de plasma es de 20,0 ng/ml.

El ULOQ del Endothal en muestra de plasma es de 3000 ng/ml.

BLQ: Por debajo del límite de cuantificación

Tabla 7.5: Datos de concentración media e individual en hígado-tiempo de Endothal tras una dosis IV de 105 a 1 mg/kg en ratas SD

10

Tiempo (h)	Individual	Media (ng/g)
0,25	475	462
1	541	386
2	151	304
6	76,9	163
10	70,0	156
24	BQL	63,8

La muestra de hígado se homogeneizó con 3 volúmenes (v/p) de solución de homogeneización (PBS a pH 7,4).

Concentración en hígado = Conc. en el homogeneizado hepático x 4, suponiendo que 1 g de tejido de hígado húmedo equivale a 1 ml.

El LLOQ del Endothal en la muestra de homogeneizado hepático es de 20,0 ng/ml.

El ULOQ del Endothal en muestra de homogeneizado hepático es de 3000 ng/ ml.

BLQ: Por debajo del límite de cuantificación

Tabla 7.6: Proporción de concentración en hígado con respecto a la concentración en plasma de Endothal tras una dosis IV de 105 a 1 mg/kg en ratas SD

15

Tiempo (h)	Individual	Media
0,25	1,81	2,46
1	7,76	8,54
2	6,51	NA
6	NA	NA
10	NA	7,12
24	NA	NA

NA: No applicable

Tabla 7.7. Parámetros farmacocinéticos medios de 105 después de una dosis IV de 1 mg/kg en ratas SD macho

Matriz	Vía de dosificación (Dosis)	AUC _(0-t)	AUC _(0-∞)	t _{1/2z}	T _{máx}	C _{máx}	CL	V _{ss}	MRT _{INF}	AUC _{último-hígado/AUC_{último-plasma}}
		h*ng/ml	h*ng/ml	h	h	ng/ml	l/h/kg	l/kg	h	AUC _{último-Plasma}
Plasma	IV (1 mg/kg)	1511	1526	0,309	NA	NA	0,655	0,215	0,328	NA
Hígado		1019	NA	NA	0,25	1029	NA	NA	NA	67,4

NA: No aplicable

5

Tabla 7.8. Parámetros farmacocinéticos medios de Endothal después de una dosis IV de 105 a 1 mg/kg en ratas SD macho

Matriz	Vía de dosificación (Dosis)	AUC _(0-t)	AUC _(0-∞)	t _{1/2}	T _{máx}	C _{máx}	AUC _{último-hígado/AUC_{último-plasma}}	
		h*ng/ml	h*ng/ml	h	h	ng/ml		
Plasma	IV (1 mg/kg)	355	673	10,1	0,250	226	NA	
Hígado		3152	4896	19,0	0,250	469	888	

NA: No aplicable

10

IV-105 a 1 mg/kg

Después de una dosis IV de 105 a 1 mg/kg en ratas SD macho, la concentración de 105 en plasma de rata disminuyó con una semivida terminal (T_{1/2}) de 0,309 horas. El área bajo la curva desde el tiempo 0 hasta el último punto de tiempo (AUC_{último}) y desde el tiempo 0 hasta el infinito (AUC_{INF}) fueron de 1511 y 1526 h*ng/ml, respectivamente. El aclaramiento total CL y el volumen de distribución en estado estable V_{ss} fueron de 0,655 l/h/kg y 0,215 l/kg, respectivamente.

Los valores medios de C_{máx} en el hígado fueron de 1029 ng/g y el valor de T_{máx} correspondiente fue de 0,25 h. El valor medio de AUC_(0-último) fue de 1019 ng/g*h. La proporción de AUC_(0-t) del hígado frente al plasma fue de 67,4.

Endothal

Tras la administración intravenosa de 105 a 1 mg/kg a ratas SD macho, la concentración de Endothal en plasma de rata disminuyó con una semivida terminal (T_{1/2}) de 10,1 horas. El área bajo la curva desde el tiempo 0 hasta el último punto de tiempo (AUC_{último}) y desde el tiempo 0 hasta el infinito (AUC_{INF}) fueron de 355 y 673 h*ng/ml, respectivamente. Los valores medios de C_{máx} y T_{máx} en plasma fueron de 226 ng/ml y 0,25 h, respectivamente.

Los valores medios de C_{máx} en el hígado fueron de 469 ng/g y el valor de T_{máx} correspondiente fue de 0,25 h. Los valores medios de AUC_(0-último) y AUC_(0-V) fueron de 3152 y 4896 ng/g*h, respectivamente. La proporción de AUC_(0-t) del hígado frente al plasma fue de 888.

Ejemplo 3. Estudio farmacocinético del Compuesto 113

El fin de este estudio fue determinar los parámetros farmacocinéticos de 113, 100 y Endothal tras las administraciones individuales intravenosa (IV) u oral (VO) de 113 a ratas SD macho. El 113 se disolvió en NaHCO₃ al 4 % en solución salina para la administración IV. El procedimiento detallado de preparación de la solución de dosificación se presentó en el Apéndice I.

Fuente de los animales

Especie	Género	Proveedor	N.º de certificado
Ratas SD	Macho	SLAC Laboratory Animal Co. LTD	SCXK (SH) 2007-0005

Se sometieron al estudio 15 animales. Los animales del grupo IV tuvieron libre acceso a comida y agua. Para el grupo de la dosis de VO, los animales se mantuvieron en ayunas durante la noche antes de la dosificación, y la comida se reanudó 4 horas después de la dosis. Se usó un animal adicional para la generación de hígado, cerebro y plasma en

blanco (5 ml por animal). El hígado, cerebro y plasma en blanco resultantes se aplicaron luego al desarrollo del método bioanalítico y al bioanálisis de las muestras para todo el estudio.

Diseño del estudio en vida

5

Tratamiento Grupo	Peso corporal (g)	N.º de animales	Vía de administración	Dosis	Dosis	Dosis	Puntos de tiempo
				Nivel*	Conc.	Volumen	
				(mg/kg)	(mg/ml)	(ml/kg)	
1	275-295	12	IV	1,4	1,4	1	Muestreo a las 0,25, 1, 2, 6, 10 y 24 horas después de la dosis. Finalmente, se extraen muestras de plasma, cerebro e hígado del mismo animal.
2	275-295	2	VO	1,4	0,14	10	Muestreo a las 0,25, 1, 2, 6, 10 y 24 horas después de la dosis. Sangrado en serie del mismo animal solo para el plasma.

*La dosis se expresó como base libre de 113.

Dosificación, muestreo, procesamiento de muestras y almacenamiento de muestras

10 La inyección IV se realizó a través de la vena dorsal del pie. La VO fue a través de sonda oral.

Extracción de sangre: El animal se retiene manualmente. Se extraen aproximadamente 200 µl de sangre/punto de tiempo en un tubo de heparina de sodio a través de una punción cardíaca para el sangrado terminal (con anestesia de dióxido de carbono). La muestra de sangre se pondrá en hielo y se centrifugará, obteniéndose una muestra de plasma (2000 g, 5 min por debajo de 4 °C) en 10 minutos.

Extracción del hígado: El animal será sacrificado mediante inhalación de dióxido de carbono. Se abre la cavidad abdominal con unas tijeras para dejar al descubierto los órganos internos. Se sujetan la carcasa en posición vertical y se permite que los órganos caigan hacia adelante. Se cortan los tejidos conjuntivos y se extraen los órganos. Luego, se enjuagan los órganos con solución salina fría, se secan sobre papel de filtro, se colocan en un tubo con tapa de rosca y se pesan, se congelan rápidamente, colocándolos en hielo seco de inmediato.

Extracción del cerebro: Se realiza una incisión en la línea media del cuero cabelludo de los animales y se retrae la piel. Usando pequeñas cortadoras de hueso y gubias, se retira el cráneo que recubre el cerebro. Se retira el cerebro con una espátula y se enjuaga con solución salina fría, se seca sobre papel filtro, se coloca en un tubo con tapa de rosca y se pesa, se congela rápidamente, colocándolo en hielo seco de inmediato. El tejido cerebral se homogeneizará durante 2 min con 3 volúmenes (v/p) de solución de homogeneización (PBS a pH 7,4) justo antes del análisis. Las muestras de plasma, cerebro e hígado se almacenaron a aproximadamente -80 °C hasta el análisis. Las muestras de soporte se desecharán tres semanas después de la finalización de la vida a menos que se solicite. Las soluciones de dosificación no usadas se desecharán en el transcurso de las tres semanas posteriores a la finalización del estudio.

Método analítico del análisis LC-MS-MS para 113

Instrumento	UPLC/MS-MS-010 (API-4000)
Matriz	Plasma y homogeneizado cerebral y hepático de rata SD
Analito(S)	113
Patrón(es) interno(s)	Dexametasona/Propranolol
Condiciones de MS	ESI: Ión positivo
	Detección MRM
	LB-113: $[M+H]^+ m/z 399,1 \rightarrow 251,2$
	Dexametasona: $[M+H]^+ m/z 393,3 \oplus 373,1$
	Propranolol: $[M+H]^+ m/z 260,2 \rightarrow 116,1$
	Fase móvil A: $H_2O\text{-FA al } 0,1\text{ \%}-NH_4OAc 5\text{ mM}$
	Fase móvil B: ACN
	Tiempo (min) Fase móvil B (%)
	0,20 2,00
	0,60 95,0
	1,20 95,0
	1,21 2,00
	1,80 parada
	Columna: ACQUITY UPLC HSS T3 (2,1 x 50 mm, 1,8 μ m)
	Caudal: 0,60 ml/min
	Temperatura de la columna: 60 °C
	Tiempo de retención:
	LB-113: 0,95 min
	Dexametasona: 1,02 min
	Propranolol: 0,92 min
	Para las muestras de plasma:
	Se añadió una alícuota de muestra de 30 μ l con 100 μ l de IS (dexametasona, 100 ng/ml en Propanolol, 50 ng/ml en ACN). Se agitó la mezcla con formación de vórtice durante 10 min a 750 rpm y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. Se inyectó una alícuota de sobrenadante de 1 μ l para el análisis de LC-MS/MS.
	Para las muestras de plasma diluidas:
Condiciones de HPLC	Se diluyó una alícuota de muestra de plasma de 3 μ l con 27 μ l de plasma en blanco. El siguiente procedimiento de procesamiento fue el mismo que las muestras de plasma sin diluir.
	Para las muestras de homogeneizado cerebral:
	Se homogeneizaron las muestras de cerebro con 3 volúmenes (v/p) de solución de homogeneización de PBS (pH 7,4) durante 2 min. Se añadió una alícuota de muestra de homogeneizado tisular de 30 μ l con 100 μ l de IS (dexametasona, 100 ng/ml y Propanolol, 50 ng/ml en ACN). Se agitó con formación de vórtice a 750 rpm durante 10 min y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. Se inyectó una alícuota de sobrenadante de 1 μ l para el análisis de LC-MS/MS.
	Para las muestras de homogeneizado de hígado:
	Se homogeneizaron las muestras de hígado con 3 volúmenes (v/p) de solución de homogeneización de PBS (pH 7,4) durante 2 min. Se añadió una alícuota de muestra de homogeneizado tisular de 30 μ l con 100 μ l de IS (dexametasona, 100 ng/ml y Propanolol, 50 ng/ml en ACN). Se agitó con formación de vórtice a 750 rpm durante 10 min y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. Se inyectó una alícuota de sobrenadante de 1 μ l para el análisis de LC-MS/MS.
	Para la preparación de todas las muestras, se deja descongelar la calibración, el control de calidad, los blancos y las muestras de prueba a 4 °C (nominal). Y cada etapa se mantiene en un baño de hielo o a 4 °C.
Curva de calibración	1,00-3000 ng/ml para LB-113 en plasma y homogeneizado cerebral y hepático de rata SD.

Método analítico del análisis LC-MS-MS para el Endothal

Instrumento	UPLC/MS-MS-015 (API-5500, Q-trap)												
Matriz	Plasma y homogeneizado cerebral y hepático de rata SD												
Analito(S)	Endothal												
Patrón(es) interno(s)	Diclofenaco												
Condiciones de MS	<p>ESI: Ión negativo</p> <p>Detección MRM</p> <p>Endothal: [M-H]⁻ m/z 184,9 → 141,0</p> <p>Diclofenaco: [M-H]⁻ m/z 294,2 → 249,9</p>												
Condiciones de HPLC	<p>Fase móvil A: H₂O-FA al 0,1 %-NH₄OAc 5 mM</p> <p>Fase móvil B: ACN</p> <table> <thead> <tr> <th>Tiempo (min)</th> <th>Fase móvil B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0,40</td> <td>2,00</td> </tr> <tr> <td>1,00</td> <td>85,0</td> </tr> <tr> <td>1,50</td> <td>85,0</td> </tr> <tr> <td>1,51</td> <td>2,00</td> </tr> <tr> <td>2,00</td> <td>parada</td> </tr> </tbody> </table> <p>Columna: ACQUITY UPLC HSS T3 (2,1 x 50 mm, 1,8 μm)</p> <p>Caudal: 0,60 ml/min</p> <p>Temperatura de la columna: 60 °C</p> <p>Tiempo de retención:</p> <p>Endothal: 0,87 min</p> <p>Diclofenaco: 1,28 min</p>	Tiempo (min)	Fase móvil B (%)	0,40	2,00	1,00	85,0	1,50	85,0	1,51	2,00	2,00	parada
Tiempo (min)	Fase móvil B (%)												
0,40	2,00												
1,00	85,0												
1,50	85,0												
1,51	2,00												
2,00	parada												
Para las muestras de plasma: Se añadió una alícuota de muestra de 30 μl con 100 μl de IS (Diclofenaco, 100 ng/ml en ACN). Se agitó la mezcla con formación de vórtice durante 10 min a 750 rpm y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. Se inyectó una alícuota de sobrenadante de 3 μl para el análisis de LC-MS/MS.													
Para las muestras de homogeneizado cerebral: Se homogeneizaron las muestras de cerebro con 3 volúmenes (v/p) de solución de homogeneización de PBS (pH 7,4) durante 2 min. Se añadió una alícuota de muestra de homogeneizado tisular de 30 μl con 100 μl de IS (Diclofenaco, 100 ng/ml en ACN). Se agitó con formación de vórtice a 750 rpm durante 10 min y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. Se inyectó una alícuota de sobrenadante de 3 μl para el análisis de LC-MS/MS.													
Para las muestras de homogeneizado de hígado: Se homogeneizaron las muestras de hígado con 3 volúmenes (v/p) de solución de homogeneización de PBS (pH 7,4) durante 2 min. Se añadió una alícuota de muestra de homogeneizado tisular de 30 μl con 100 μl de IS (Diclofenaco, 100 ng/ml en ACN). Se agitó con formación de vórtice a 750 rpm durante 10 min y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. Se inyectó una alícuota de sobrenadante de 3 μl para el análisis de LC-MS/MS.													
Para la preparación de todas las muestras, se deja descongelar la calibración, el control de calidad, los blancos y las muestras de prueba a 4 °C (nominal). Y cada etapa se mantiene en un baño de hielo o a 4 °C.													
Curva de calibración	20,00-3000 ng/ml para Endothal en plasma y homogeneizado cerebral y hepático de rata SD.												

Método analítico del análisis LC-MS-MS para el Compuesto 100

Instrumento	UPLC/MS-MS-010 (API-4000)												
Matriz	Plasma y homogeneizado cerebral y hepático de rata SD												
Analito(S)	100												
Patrón(es) interno(s)	Diclofenaco/Propranolol												
Condiciones de MS	<p>ESI: Ión positivo</p> <p>Detección MRM</p> <p>LB-100: $[M+H]^+ m/z 269,3 \rightarrow 101,1$</p> <p>Diclofenaco: $[M+H]^+ m/z 296,0 \text{®} 250,3$</p> <p>Propranolol: $[M+H]^+ m/z 260,2 \rightarrow 116,1$</p> <p>Fase móvil A: $H_2O\text{-FA al } 0,1\% \text{-NH}_4\text{OAc } 5\text{ mM}$</p> <p>Fase móvil B: ACN</p>												
	<table> <thead> <tr> <th>Tiempo (min)</th> <th>Fase móvil B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0,20</td> <td>15,0</td> </tr> <tr> <td>1,60</td> <td>98,0</td> </tr> <tr> <td>3,10</td> <td>98,0</td> </tr> <tr> <td>3,11</td> <td>15,0</td> </tr> <tr> <td>5,00</td> <td>parada</td> </tr> </tbody> </table> <p>Columna: Agilent Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm, 5 μm)</p> <p>Caudal: 0,80 ml/min</p> <p>Temperatura de la columna: 40 °C</p> <p>Tiempo de retención:</p> <p>LB-100: 1,75 min</p> <p>Diclofenaco: 3,56 min</p> <p>Propranolol: 2,77 min</p>	Tiempo (min)	Fase móvil B (%)	0,20	15,0	1,60	98,0	3,10	98,0	3,11	15,0	5,00	parada
Tiempo (min)	Fase móvil B (%)												
0,20	15,0												
1,60	98,0												
3,10	98,0												
3,11	15,0												
5,00	parada												
Condiciones de HPLC	<p>Para las muestras de plasma:</p> <p>Se añadió una alícuota de muestra de 30 μl con 100 μl de IS (Diclofenaco, 100 ng/ml en Propranolol, 50 ng/ml en ACN). Se agitó la mezcla con formación de vórtice durante 10 min a 750 rpm y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. Se inyectó una alícuota de sobrenadante de 5 μl para el análisis de LC-MS/MS.</p> <p>Para las muestras de homogeneizado cerebral:</p> <p>Se homogeneizaron las muestras de cerebro con 3 volúmenes (v/p) de solución de homogeneización de PBS (pH 7,4) durante 2 min. Se añadió una alícuota de muestra de homogeneizado tisular de 30 μl con 100 μl de IS (Diclofenaco, 100 ng/ml y Propranolol, 50 ng/ml en ACN). Se agitó con formación de vórtice a 750 rpm durante 10 min y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. Se inyectó una alícuota de sobrenadante de 5 μl para el análisis de LC-MS/MS.</p> <p>Para las muestras de homogeneizado de hígado:</p> <p>Se homogeneizaron las muestras de hígado con 3 volúmenes (v/p) de solución de homogeneización de PBS (pH 7,4) durante 2 min. Se añadió una alícuota de muestra de homogeneizado tisular de 30 μl con 100 μl de IS (Diclofenaco, 100 ng/ml y Propranolol, 50 ng/ml en ACN). Se agitó con formación de vórtice a 750 rpm durante 10 min y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. Se inyectó una alícuota de sobrenadante de 5 μl para el análisis de LC-MS/MS.</p> <p>Para la preparación de todas las muestras, se deja descongelar la calibración, el control de calidad, los blancos y las muestras de prueba a 4 °C (nominal). Y cada etapa se mantiene en un baño de hielo o a 4 °C.</p>												
Curva de calibración	<p>3-3000 ng/ml para LB-100 en plasma de rata SD;</p> <p>6-3000 ng/ml para LB-100 en homogeneizado cerebral y hepático de rata SD.</p>												

Análisis farmacocinético

5

Software: Los parámetros PK fueron determinados por el modelo no compartimental de la herramienta de análisis no compartimental, Software Pharsight Phoenix WinNonlin® 6.2.

10 Regla "BQL": Datos de concentración por debajo del 80 % del LLOQ (LLOQ = 1,00 ng/ml en plasma, y homogeneizado cerebral y hepático para 113. LLOQ = 20,00 ng/ml en plasma y homogeneizado cerebral y hepático de rata para

Endothal. El LLOQ = 3,00 ng/ml para 100 en plasma de rata, 6,00 ng/ml para 100 en homogeneizado cerebral y hepático de rata) se reemplazó con "BQL" y se excluyó de los gráficos y de la estimación de los parámetros PK. Los datos de concentración dentro del 80 %-120 % del LLOQ se consideraron dentro de la variación instrumental normal y se presentaron en los resultados.

5 Cálculo de $t_{1/2}$ terminal: Los puntos de tiempo se seleccionaron automáticamente mediante el modelo de "mejor ajuste" para la estimación de la semivida terminal como la primera opción. La selección manual se aplicó cuando el "mejor ajuste" no pudo definir bien la fase terminal.

10 Resultados

No se observaron síntomas clínicos anómalos tras las administraciones IV y PO.

15 Los datos de concentración-tiempo y los parámetros farmacocinéticos de 113, 100 y Endothal en plasma, cerebro e hígado de rata tras las administraciones IV o PO se enumeraron en las Tablas 8.1 a 8.19, y se ilustraron en las Figuras 3A-3D.

Tabla 8.1: Datos de concentración media e individual en plasma-tiempo de 113 tras una dosis IV de 1,4 mg/kg en ratas SD macho

20

Tiempo (h)	Individual	Media (ng/ ml)
0,25	173 193	183
1	10,8 9,96	10,4
2	BQL BQL	BQL
6	BQL BQL	BQL
10	BQL BQL	BQL
24	BQL BQL	BQL

El LLOQ (Límite inferior de cuantificación, *Lower Limit of Quantification*) de 113 en muestra de plasma es de 1,00 ng/ml.

25 El ULOQ (Límite superior de cuantificación, *Upper Limit of Quantification*) de 113 en muestra de plasma es de 3000 ng/ml.

BLQ: Por debajo del límite de cuantificación

Tabla 8.2: Datos de concentración en plasma individual y media frente al tiempo de 113 después de una dosis VO de 1,4 mg/kg en ratas SD macho

30

Tiempo (h)	Individual	Media (ng/ ml)
0,25	18,3	17,0
1	4,61	8,56
2	BQL	2,15
6	BQL	BQL
10	BQL	BQL
24	BQL	BQL

El LLOQ (Límite inferior de cuantificación, *Lower Limit of Quantification*) de 113 en muestra de plasma es de 1,00 ng/ml.

35 El ULOQ (Límite superior de cuantificación, *Upper Limit of Quantification*) de 113 en muestra de plasma es de 3000 ng/ml.

BLQ: Por debajo del límite de cuantificación

Tabla 8.3: Datos de concentración media e individual en hígado-tiempo de 113 tras una dosis IV de 1,4 mg/kg en ratas SD macho

40

Tiempo (h)	Individual	Media (ng/g)
0,25	55,5	36,9
1	14,6	13,2
2	BQL	BQL
6	BQL	BQL
10	BQL	BQL
24	BQL	BQL

La muestra de hígado se homogeneizó con 3 volúmenes (v/p) de solución de homogeneización (PBS a pH 7,4).

Concentración en hígado = Conc. en el homogeneizado hepático x 4, suponiendo que 1 g de tejido de hígado húmedo equivale a 1 ml.

El LLOQ de 113 en la muestra de homogeneizado hepático es de 1,00 ng/ml.

El ULOQ de 113 en muestra de plasma es de 3000 ng/ml.

BLQ: Por debajo del límite de cuantificación

Tabla 8.4: Proporción de concentración en hígado con respecto a la concentración en plasma de 113 tras una dosis IV de 1,4 mg/kg en ratas SD macho

5

Tiempo (h)	Individual	Media
0,25	0,321	0,191
1	1,35	1,18
2	NA	NA
6	NA	NA
10	NA	NA
24	NA	NA

NA: No aplicable

Tabla 8.5: Datos de concentración cerebral individual y media frente al tiempo de 113 tras una dosis IV de 1,4 mg/kg en ratas macho SD

10

Tiempo (h)	Individual	Media (ng/g)
0,25	86,2	94,5
1	5,80	6,42
2	BQL	BQL
6	BQL	BQL
10	BQL	BQL
24	BQL	BQL

Se homogeneizó la muestra de cerebro con 3 volúmenes (v/p) de solución de homogeneización (PBS a pH 7,4).

Concentración en cerebro = conc. Del homogeneizado cerebral x 4, suponiendo que 1 g de tejido de cerebro húmedo equivale a 1 ml.

El LLOQ de 113 en la muestra de homogeneizado cerebral es de 1,00 ng/ml.

El ULOQ de 113 en muestra de homogeneizado cerebral es de 3000 ng/ml.

BLQ: Por debajo del límite de cuantificación

Tabla 8.6: Proporción de la concentración en cerebro con respecto a la concentración en plasma de 113 tras una dosis IV de 1,4 mg/kg en ratas SD macho

15

Tiempo (h)	Individual	Media
0,25	0,498	0,490
1	0,537	0,645
2	NA	NA
6	NA	NA
10	NA	NA
24	NA	NA

NA: No aplicable

Tabla 8.7: Datos de concentración en plasma individual y media frente al tiempo de Endothal tras una dosis IV de 113 a 1,4 mg/kg en ratas SD

Tiempo (h)	Individual	Media (ng/ ml)
0,25	24,9	43,1
1	41,6	38,9
2	43,3	30,4
6	BQL	BQL
10	BQL	BQL
24	BQL	BQL

El LLOQ del Endothal en muestras de plasma es de 20,0 ng/ml.

El ULOQ del Endothal en muestra de plasma es de 3000 ng/ml.

BLQ: Por debajo del límite de cuantificación

5

Tabla 8.8: Datos de concentración en hígado individual y media frente al tiempo de Endothal tras una dosis IV de 113 a 1,4 mg/kg en ratas SD

Tiempo (h)	Individual	Media (ng/g)
0,25	727	858
1	902	1066
2	998	897
6	526	502
10	288	223
24	66,9	67,9

La muestra de hígado se homogeneizó con 3 volúmenes (v/p) de solución de homogeneización (PBS a pH 7,4).

Concentración en hígado = Conc. en el homogeneizado hepático x 4, suponiendo que 1 g de tejido de hígado húmedo equivale a 1 ml.

El LLOQ del Endothal en la muestra de homogeneizado hepático es de 20,0 ng/ml.

El ULOQ del Endothal en muestra de homogeneizado hepático es de 3000 ng/ ml.

BLQ: Por debajo del límite de cuantificación

10

Tabla 8.9: Proporción de concentración en hígado con respecto a la concentración en plasma de Endothal tras una dosis IV de 113 a 1,4 mg/kg en ratas SD

Tiempo (h)	Individual	Media
0,25	29,2	22,7
1	21,7	27,9
2	23,0	34,4
6	NA	NA
10	NA	NA
24	NA	NA

NA: No aplicable

15

Tabla 8.10: Datos de concentración en cerebro individual y media frente al tiempo de Endothal tras una dosis IV de 113 a 1,4 mg/kg en ratas SD

Tiempo (h)	Individual	Media (ng/g)
0,25	BQL	BQL
1	BQL	BQL
2	BQL	BQL
6	BQL	BQL
10	BQL	BQL
24	BQL	BQL

Se homogeneizó la muestra de cerebro con 3 volúmenes (v/p) de solución de homogeneización (PBS a pH 7,4).

Concentración en cerebro = conc. Del homogeneizado cerebral x 4, suponiendo que 1 g de tejido de cerebro húmedo equivale a 1 ml.

El LLOQ del Endothal en la muestra de homogeneizado cerebral es de 20,0 ng/ml.

El ULOQ de Endothal en muestra de homogeneizado cerebral es de 3000 ng/ ml.

BLQ: Por debajo del límite de cuantificación

Tabla 8.11: Proporción de concentración en cerebro con respecto a la concentración en plasma de Endothal tras una dosis IV de 113 a 1,4 mg/kg en ratas SD

5

Tiempo (h)	Individual	Media
0,25	NA	NA
1	NA	NA
2	NA	NA
6	NA	NA
10	NA	NA
24	NA	NA

NA: No aplicable

Tabla 8.12: Datos de concentración en plasma individual y media frente al tiempo de 100 tras una dosis IV de 113 a 1,4 mg/kg en ratas SD

10

Tiempo (h)	Individual	Media (ng/ ml)
0,25	510	598
1	273	222
2	135	90,2
6	3,25	3,25
10	BQL	BQL
24	BQL	BQL

El LLOQ (Límite inferior de cuantificación, *Lower Limit of Quantification*) de 100 en muestra de plasma es de 3,00 ng/ml.

El ULOQ (Límite superior de cuantificación, *Upper Limit of Quantification*) de 100 en muestra de plasma es de 3000 ng/ ml.

BLQ: Por debajo del límite de cuantificación

Tabla 8.13. Datos de concentración en hígado individual y media frente al tiempo de 100 tras una dosis IV de 113 a 1,4 mg/kg en ratas SD

15

Tiempo (h)	Individual	Media (ng/g)
0,25	2090	1895
1	1360	1025
2	425	366
6	23,8	22,8
10	BQL	BQL
24	BQL	BQL

La muestra de hígado se homogeneizó con 3 volúmenes (v/p) de solución de homogeneización (PBS a pH 7,4).

Concentración en hígado = Conc. en el homogeneizado hepático x 4, suponiendo que 1 g de tejido de hígado húmedo equivale a 1 ml.

El LLOQ de 100 en la muestra de homogeneizado hepático es de 6,00 ng/ml.

El ULOQ de 100 en muestra de plasma es de 3000 ng/ml.

BLQ: Por debajo del límite de cuantificación

Tabla 8.14. Proporción de concentración en hígado con respecto a la concentración en plasma de 100 tras una dosis IV de 113 a 1,4 mg/kg en ratas SD

5

Tiempo (h)	Individual	Media
0,25	4,10	3,47
1	4,98	4,52
2	3,15	4,95
6	7,32	7,32
10	NA	NA
24	NA	NA

NA: No aplicable

Tabla 8.15. Datos de concentración en cerebro individual y media frente al tiempo de 100 tras una dosis IV de 113 a 1,4 mg/kg en ratas SD

10

Tiempo (h)	Individual	Media (ng/g)
0,25	BQL	BQL
1	BQL	BQL
2	BQL	BQL
6	BQL	BQL
10	BQL	BQL
24	BQL	BQL

Se homogeneizó la muestra de cerebro con 3 volúmenes (v/p) de solución de homogeneización (PBS a pH 7,4).

Concentración en cerebro = conc. Del homogeneizado cerebral x 4, suponiendo que 1 g de tejido de cerebro húmedo equivale a 1 ml.

El LLOQ de 100 en la muestra de homogeneizado cerebral es de 6,00 ng/ml.

El ULOQ de 100 en muestra de homogeneizado cerebral es de 3000 ng/ml.

BLQ: Por debajo del límite de cuantificación

Tabla 8.16: Proporción de concentración en cerebro con respecto a la concentración en plasma de 100 tras una dosis IV de 113 a 1,4 mg/kg en ratas SD

15

Tiempo (h)	Individual	Media
0,25	NA	NA
1	NA	NA
2	NA	NA
6	NA	NA
10	NA	NA
24	NA	NA

NA: No aplicable

Tabla 8.17: Parámetros farmacocinéticos medios de 113 después de una dosis IV de 1,4 mg/kg en ratas SD macho

Matriz	Vía de dosificación (Dosis)	AUC _(0-t)	AUC _(0-∞)	t _{1/2}	T _{máx}	C _{máx}	CL	v _{ss}	MRT _{INF}	F	AUC _{último-hígado(cerebro)/}
		h*ng/ml	h*ng/ml	h	h	ng/ml	l/h/kg	l/kg	h	%	AUC _{último-plasma}
Plasma	VO (1,4 mg/kg)	15,7	NA	NA	0,25	17,7	NA	NA	NA	10,1	NA
Plasma	IV (1,4 mg/kg)	155	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Hígado		28,1	NA	NA	0,25	46,2	NA	NA	NA	NA	18,1
Cerebro		47,5	NA	NA	0,25	90,4	NA	NA	NA	NA	30,6

5

Tabla 8.18: Parámetros farmacocinéticos medios de Endothal después de una dosis IV de 113 a 1,4 mg/kg en ratas SD macho

Matriz	Vía de dosificación (Dosis)	AUC _(0-t)	AUC _(0-∞)	t _{1/2}	T _{máx}	C _{máx}	AUC _{último-hígado/}
		h*ng/ml	h*ng/ml	h	h	ng/ml	AUC _{último-plasma}
Plasma	IV (1,4 mg/kg)	70,7	NA	NA	0,25	43,1	NA
Hígado		8086	8678	6,04	1	1066	11438
Cerebro		NA	NA	NA	NA	NA	NA

10

Tabla 8.19: Parámetros farmacocinéticos medios de 100 después de una dosis IV de 113 a 1,4 mg/kg en ratas SD macho

Matriz	Vía de dosificación (Dosis)	AUC _(0-t)	AUC _(0-∞)	t _{1/2z}	T _{máx}	C _{máx}	AUC _{último-hígado/}
		h*ng/ml	h*ng/ml	h	h	ng/ml	AUC _{último-plasma}
Plasma	IV (1 mg/kg)	703	707	0,825	0,25	554	NA
Hígado		2804	2834	0,934	0,25	1895	399
Cerebro		NA	NA	NA	NA	NA	NA

15

IV-113 a 1,4 mg/kg

Tras una dosis IV de 113 a 1,4 mg/kg en ratas SD macho, el área bajo la curva desde el tiempo 0 hasta el último punto de tiempo (AUC_{último}) fue de 155 h*ng/ml.

20

Los valores medios de C_{máx} en el hígado fueron de 46,2 ng/g y el valor de T_{máx} correspondiente fue de 0,25 h. El valor medio de AUC_(0-último) fue de 28,1 ng/g*h. La proporción de AUC_(0-t) del hígado frente al plasma fue de 18,1.

25

Los valores medios de C_{máx} en el cerebro fueron de 90,4 ng/g y el valor de T_{máx} correspondiente fue de 0,25 h. El valor medio de AUC_(0-último) fue de 47,5 ng/g*h. La proporción de AUC_(0-t) del hígado frente al plasma fue de 30,6.

VO-113 a 1,4 mg/kg

30

Tras una dosis VO de 113 a 1,4 mg/kg, el valor de C_{máx} en el plasma de rata fue de 17,7 ng/g y el valor medio de T_{máx} correspondiente fue de 0,250 h. El área bajo la curva desde el tiempo 0 hasta el último punto de tiempo AUC_{último} fue de 15,7 h*ng/ml. Tras la dosis IV de 1,4 mg/kg y la dosis PO de 1,4 mg/kg, La biodisponibilidad de este compuesto en rata SD se estimó en un 10,1 %.

Endothal

35

Tras la administración intravenosa de 113 a 1,4 mg/kg a ratas SD macho, el área bajo la curva desde el tiempo 0 hasta el último punto de tiempo (AUC_{último}) fue de 70,7 h*ng/ml. Los valores medios de C_{máx} y T_{máx} en plasma fueron de 43,1 ng/ml y 0,25 h, respectivamente.

40

Los valores medios de C_{máx} en el hígado fueron de 1066 ng/g y el valor de T_{máx} correspondiente fue de 1,00 h. Los valores medios de AUC_(0-último) y AUC_(0-∞) fueron de 8086 y 8678 ng/g*h, respectivamente. La proporción de AUC_(0-t) del hígado frente al plasma fue de 11438.

Compuesto 100

5 Los valores medios de $C_{máx}$ y $T_{máx}$ en plasma fueron de 554 ng/ml y 0,25 h, respectivamente. Los valores medios de $AUC_{(0-último)}$ y $AUC_{(0-∞)}$ fueron de 703 ng/ml*h y 707 ng/ml*h, respectivamente.

10 Los valores medios de $C_{máx}$ en el hígado fueron de 1895 ng/g y el valor de $T_{máx}$ correspondiente fue de 0,25 h. Los valores medios de $AUC_{(0-último)}$ y $AUC_{(0-∞)}$ fueron de 2804 ng/g*h y 2834 ng/g*h, respectivamente. La proporción de $AUC_{(0-t)}$ del hígado frente al plasma fue de 399.

Ejemplo 4. Estudio farmacocinético del Compuesto 151

15 Se realizó un estudio farmacocinético de 151 en ratas SD. El estudio consistió en dos niveles de dosis a 1,0 (IV) y 10 (oral) mg/kg. Las muestras de sangre se extrajeron en tiempos predeterminados de ratas y se centrifugaron para separar el plasma. Se desarrolló un método de LC/MS/MS para determinar el artículo de prueba en muestras de plasma. Se calcularon los parámetros farmacocinéticos de 151 tras la administración IV y oral a ratas SD. Se evaluó la biodisponibilidad absoluta.

Diseño del estudio

20 Se asignó un total de 5 ratas SD macho a este estudio como se muestra en la tabla que se presenta a continuación:

Grupos	Número de ratas (macho)	Vía de administración	Nivel de dosis (mg/kg)	Volumen de dosis (ml/kg)
1	3	oral	10	10
2	2	IV	1,0	5,0

25 Preparación de las dosis y administración de las dosis

30 151 (PM: 282,34, pureza del 99,2 %, n.º de lote 20110512) se preparó disolviendo el artículo en PBS (pH 7,4) el día de la dosificación. La concentración final del artículo de prueba fue de 0,2 mg/ml para la administración IV y de 1,0 mg/ml para la administración oral. Las soluciones del artículo de prueba se administraron usando el peso corporal más reciente para cada animal.

Recogida de muestras

35 Se extrajo sangre (aproximadamente 0,3 ml) a través del plexo orbital en tubos que contenían heparina sódica a las 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 5, 7, 9 y 24 horas de la administración oral; a los 5 min, 15 min, 0,5, 1, 2, 3, 5, 7, 9 y 24 horas después de la administración IV. Las muestras se centrifugaron durante 5 min a 4 °C con la centrífuga ajustada a 11.000 rpm para separar el plasma. Las muestras de plasma obtenidas se almacenaron congeladas a una temperatura de aproximadamente -70 °C hasta el análisis.

40 Preparación de las muestras de plasma

45 Se descongelaron las muestras de plasma congeladas a temperatura ambiente y se agitaron bien con formación de vórtice. Con una pipeta, se transfirió una alícuota (30 µl) de plasma a un tubo de polipropileno cónico de 1,5 ml. A cada muestra, se añadieron 160 µl de acetonitrilo. Después, se mezclaron las muestras vigorosamente con formación de vórtice durante 1 min. Tras la centrifugación a 11.000 rpm durante 5 min, se inyectó una alícuota de 15 µl del sobrenadante en el sistema de LC-MS/MS para su análisis.

Preparación de muestras de calibración

50 55 Se prepararon patrones de calibración añadiendo 30 µl de las soluciones patrón de 151 a 30 µl de plasma de rata en blanco heparinizado. Las concentraciones nominales de patrón de la curva patrón fueron 1,00, 3,00, 10,0, 30,0, 100, 300, 1000 y 3000 ng/ml.

Sistema de LC/MS/MS

60 55 El análisis se realizó usando un sistema de LC-MS/MS que consistía en los siguientes componentes: sistema de HPLC: Instrumento Agilent serie 1200 que consiste en desgasificador de vacío G1312B, bomba binaria G1322A, horno de columna G1316B y muestreador automático G1367D (Agilent, EE.UU.); Sistema de MS/MS: espectrómetro de masas Agilent 6460 de triple cuadrupolo, dotado de una interfaz APCI (Agilent, EE.UU.); Sistema de datos: Software MassHunter (Agilent, EE. UU.).

Condiciones cromatográficas

La separación cromatográfica se llevó a cabo a temperatura ambiente - Columna analítica: Columna C₈ (4,6 mm x 150 mm de D.I., 5 µm, Agilent, EE.UU.); Fase móvil: Acetonitrilo: acetato amónico 10 mM (75:25, v/v); Caudal: 0,80 ml/min; Volumen de inyección: 15 µl.

5 Condiciones de espectrometría de masas
 El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo positivo. La ionización se realizó aplicando los siguientes parámetros: temperatura del gas, 325 °C; Temperatura de vaporizador, 350 °C; flujo de gas, 4 l/min; nebulizador, 1385,85 Kpa (20 psi); tensión de capilaridad, 4500 V; corriente de corona, 4 µA. 151 se detectó usando MRM de las transiciones m/z 283 → m/z 123 and m/z 283 → m/z 251, simultáneamente. Se usaron las energías de colisión optimizadas de 25 eV y 10 eV para m/z 123 y m/z 251, respectivamente.

10 Cuantificación
 La cuantificación se realizó mediante el método del patrón externo. Las concentraciones del artículo de prueba se calcularon usando una regresión lineal de mínimos cuadrados ponderada ($W = 1/x^2$).

15 Interpretación farmacocinética
 Los parámetros farmacocinéticos se evaluaron usando WinNonlin versión 5.3 (Pharsight Corp., Mountain View, CA, EE.UU.), suponiendo un modelo no compartimental para la absorción y distribución de los fármacos.

20 25
 - AUC_{0-t} es el área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo desde el punto de tiempo cero hasta el último tiempo de muestreo, calculada mediante la regla trapezoidal lineal.
 - AUC_{0-∞} es el área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo desde el tiempo cero extrapolando hasta el infinito.
 - $T_{1/2}$ es la semivida de eliminación asociada con la fase de eliminación terminal (log-lineal), que se estima mediante regresión lineal del tiempo frente al log de las concentraciones.
 30 - CL es el aclaramiento total del organismo.
 - V_{ss} es el volumen de distribución en estado estacionario.

Curva de calibración para muestras de plasma

35 La curva de calibración para L151 en plasma de rata fue lineal durante todo el estudio en el intervalo de 1,00-3000 ng/ml. La ecuación de regresión lineal de la curva de calibración fue $y = 885,6448 x + 791,9622$, $r^2 = 0,9927$, donde y representa el área máxima de 151 y x representa las concentraciones en plasma de 151.

40 Concentraciones en plasma de 151 en ratas SD
 Tras la administración IV (1,0 mg/kg) y oral (10 mg/kg) de 151 a ratas SD, se determinaron las concentraciones en plasma de los artículos de prueba mediante el método de LC/MS/MS descrito anteriormente. Las concentraciones en plasma en cada tiempo de muestreo se enumeran en las Tablas 9.1 y 9.2.

45 Interpretación de la farmacocinética
 Los principales parámetros farmacocinéticos de 151 en plasma se resumen en las Tablas 9.3 y 9.4. Tras la administración oral de 10 mg/kg a ratas SD ($n = 3$), 151 se absorbió rápidamente y la concentración máxima en plasma se produjo a las 0,5 h después de la dosis. La eliminación de 151 fue rápida con una semivida de 1,26 h. Tras la administración IV de 1,0 mg/kg ($n = 2$), la semivida de eliminación de 151 fue de 0,89 h. El aclaramiento medio de 151 del plasma de rata y el volumen de distribución en estado estacionario fueron 859 ml/h/kg y 736 ml/kg. Según la exposición (AUC_{0-∞}), la biodisponibilidad absoluta (F) de 151 fue del 54,6 % tras la administración oral a 10 mg/kg a ratas SD.

55 **Tabla 9.1: Datos analíticos de la concentración de 151 en plasma (ng/ml) en ratas SD después de la administración VO a 10 mg/kg.**

N.º de rata	Tiempo (h) 0,25	0,50	1,0	2,0	3,0	5,0	7,0	9,0	24
1	2231	2451	2204	1100	521	125	42,6	52,1	BLQ
2	2029	3934	2581	1237	660	99,4	20,7	38,2	BLQ
3	2731	3343	2538	1582	794	192	68,0	66,1	BLQ
Media	2330	3243	2441	1306	658	139	43,8	52,1	
DT	361	747	206	248	136	48	23,6	13,9	

BLQ: Debajo del límite inferior de cuantificación 1,00 ng/ml.

Tabla 9.2: Datos analíticos de la concentración de 151 en plasma (ng/ml) en ratas SD después de la administración VI a 1,0 mg/kg.

N.º de rata	Tiempo (h) 0,083	0,250	0,50	1,0	2,0	3,0	5,0	7,0	9,0	24
4	1677	1160	760	381	95,8	39,6	9,75	12,2	BLQ	BLQ
5	1301	949	607	314	103	28,1	3,63	1,83	2,01	BLQ
Media	1489	1055	683	348	99,6	33,8	6,69	7,02	1,00	

5

Tabla 9.3 Los principales parámetros farmacocinéticos de 151 en ratas SD después de la administración VO a 10 mg/kg.

N.º de rata	Tmáx (ng/ml)	Cmáx (ng/ml)	AUC _{0-t} (ng.h/ ml)	AUC _{0-∞} (ng.h/ ml)	T _{1/2} (h)	MRT (h)	F (%)
1	0,50	2451	5399	5499	1,33	1,86	
2	0,50	3934	6423	6484	1,10	1,62	
3	0,50	3343	7199	7328	1,35	1,95	
Media	0,50	3243	6340	6437	1,26	1,81	54,6
DT	0,00	747	903	916	0,14	0,17	
CV (%)	0,0	23,0	14,2	14,2	11,0	9,4	

10

Tabla 9.4: Los principales parámetros farmacocinéticos de 151 en ratas SD después de la administración IV a 1,0 mg/kg.

N.º de rata	AUC _{0-t} (ng.h/ ml)	AUC _{0-∞} (ng.h/ ml)	T _{1/2} (h)	MRT (h)	V _{ss} (ml/kg)	CL (ml/h/kg)
4	1293	1309	0,91	0,91	696	764
5	1045	1047	0,87	0,81	775	955
Media	1169	1178	0,89	0,86	736	859

15

También se midieron las concentraciones de LB100 de las muestras de plasma de LB151 y se calcularon los parámetros farmacocinéticos. LB151 se convirtió en LB100 (véanse las Tablas 9.5-9.8).

20 Tabla 9.5: Concentraciones en plasma de 100 después de la administración VO de 151 a 10 mg/kg a rata SD (ng/ml)

Grupo	N.º de rata	Tiempo (h) 0,25	0,50	1,0	2,0	3,0	5,0	7,0	9,0	24
VO-10 mg/kg	1	966	1426	882	734	236	81,1	37,9	31,6	BLQ
	2	522	1489	1141	645	396	79,4	20,3	22,5	BLQ
	3	1056	1439	1447	963	624	185	56,0	39,6	BLQ
	Media	848	1451	1156	781	419	115	38,1	31,3	
	DT	286	33	283	164	195	61	17,9	8,6	

BLQ: Debajo del límite inferior de cuantificación 10,0 ng/ml

25 Tabla 9.6: Concentraciones en plasma de 100 después de la administración IV de 151 a 1,0 mg/kg a rata SD (ng/ml)

Grupo	N.º de rata	Tiempo (h)	0,25	0,5	1,0	2,0	3,0	5,0	7,0	9,0	24
IV-1 mg/kg	4	646	345	308	257	125	32,2	10,2	BLQ	BLQ	BLQ
	5	430	239	231	182	114	33,3	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Media		538	292	270	219	120	32,7	5,10			

BLQ: Debajo del límite inferior de cuantificación 10,0 ng/ml.

Tabla 9.7: Parámetros farmacocinéticos de 100 después de la administración VO de 151 a 10 mg/kg a rata SD

Grupo	N.º de rata	T _{máx} (h)	Cmáx (ng/ml)	AUC _{0-t} (ng.h/ ml)	AUC _{0-∞} (ng.h/ ml)	T _{1/2} (h)	MRT (h)
VO-10 mg/kg	1	0,50	1426	2795	2862	1,45	2,06
	2	0,50	1489	3006	3046	1,25	1,96
	3	1,00	1447	4309	4391	1,43	2,29
	Media	0,67	1454	3370	3433	1,38	2,10
	DT	0,29	32	820	835	0,11	0,17
	CV (%)	43,3	2,2	24,3	24,3	8,1	8,1

5

Tabla 9.8: Parámetros farmacocinéticos de 100 después de la administración VI de 151 a 1,0 mg/kg a rata SD

Grupo	N.º de rata	T _{máx} (h)	Cmáx (ng/ml)	AUC _{0-t} (ng.h/ ml)	AUC _{0-∞} (ng.h/ ml)	T _{1/2} (h)	MRT (h)
IV-1 mg/kg	4	0,083	646	681	694	0,88	1,16
	5	0,083	430	481	526	0,93	1,27
	Media	0,083	538	581	610	0,91	1,21

10

Ejemplo 5. Estudio farmacocinético del Compuesto 100

Los estudios farmacocinéticos sobre 100 y su metabolito Endothal se realizaron en ratas SD. Se administró 100 por vía IV a 0,5, 1,0 y 1,5 mg/kg en ratas SD. Se extrajeron muestras de sangre, y de tejido hepático y cerebral en tiempos predeterminados de las ratas. Los métodos de LC/MS/MS se desarrollaron para determinar 100 y Endothal en muestras de plasma, hígado y cerebro. En el informe, se presentaron las concentraciones de 100 y Endothal en las muestras de plasma, hígado y cerebro.

20 Recogida de muestras
Doce (12) ratas SD hembra por grupo fueron dosificadas por VI con 100. Las ratas estuvieron en ayunas durante la noche antes de la dosificación, con libre acceso al agua. La comida fue retenida durante 2 horas después de la dosis. Se recogieron muestras de sangre, hígado y tejido cerebral de dos animales de cada grupo en cada punto de tiempo, más/menos un 10 % del tiempo programado para cada punto de tiempo. Se usaron dos animales más para el desarrollo del método analítico. Se extrajo sangre (> 0,3 ml) a través de la aorta abdominal en animales anestésicos en tubos que contenían heparina a los 15 min, y 1, 2, 6, 10 y 24 horas después de la administración IV. Se recogieron tejidos de hígado y cerebro inmediatamente después de la muerte del animal. Se extirparon tejidos hepáticos y cerebrales, y se enjuagaron con solución salina fría para evitar la sangre residual. Tras la extracción, se dispuso cada muestra en hielo, y posteriormente se centrifugaron las muestras de sangre (4 °C, 11000 rpm, 5 min) para separar el plasma. Se almacenaron las muestras de plasma, hígado y tejido cerebral a -70 °C hasta el análisis de LC-MS/MS.

25 Interpretación farmacocinética
Los parámetros farmacocinéticos se evaluaron usando WinNonlin versión 5.3 (Pharsight Corp., Mountain View, CA, EE.UU.), suponiendo un modelo no compartimental para la absorción y distribución de los fármacos. El AUC_{0-t} (AUC_{último}) es el área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo desde el punto de tiempo cero hasta el último tiempo de muestreo, calculada mediante la regla trapezoidal lineal. El AUC_{0-∞} (AUC_{INF}) es el área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo con la última concentración extrapolada basada en la constante de la tasa de eliminación.

30

Concentraciones en plasma, tejido hepático y tejido cerebral de los artículos de prueba en ratas SD

Tras la administración única IV de 100 a ratas SD, Las concentraciones en plasma, hígado y tejido cerebral tanto de 100 como de Endothal se determinaron mediante el método de LC/MS/MS descrito anteriormente. Las concentraciones en plasma, hígado y tejido cerebral en cada tiempo de muestreo se enumeran en las Tablas 10.1-10.6 y en la Figura 4A-4D. Los parámetros farmacocinéticos calculados se enumeran en la Tabla 10.7-10.8. 100 podría pasar a través de la barrera hematoencefálica (BHE) después de la administración IV a 0,5, 1,0 y 1,5 mg/kg a ratas SD. El valor medio de $C_{\text{máx}}$ en plasma fue de 1110-3664 ng/ml. Los valores medios de $C_{\text{máx}}$ en hígado y cerebro fueron de 586~2548 ng/kg y 17,4-43,5 ng/kg, respectivamente. El valor de $AUC_{\text{último}}$ en plasma fue de 695,8-7399,6 ng.h/ml, con 758,6-9081,0 ng.h/g en hígado y 10,8-125,5 ng.h/g en cerebro, respectivamente. Los valores de $T_{1/2}$ en plasma, hígado y cerebro fueron de 0,31-2,20 h, 0,78-2,01 h y 1,67-1,93 h, respectivamente.

Como se muestra en la Tabla 10.4-10.6 y en la Figura 4D-4E, se detectó Endothal en muestras de plasma e hígado después de una sola administración IV de 100 a 0,5, 1,0 y 1,5 mg/kg, y las concentraciones en plasma e hígado aumentaron con un nivel de dosis de 100, mientras que el Endothal no fue detectable en muestras de cerebro. Los valores medios de $C_{\text{máx}}$ en plasma e hígado fueron de 577-1230 ng/ml y 349-2964 ng/ml, respectivamente. Los valores de $AUC_{\text{último}}$ en plasma e hígado fueron de 546-4476 ng.h/ml y 2598-18434 ng.h/g, respectivamente. Los valores de $T_{1/2}$ en plasma e hígado fueron de 6,25-7,06 h y 4,57-10,1 h, respectivamente.

Tras la administración IV única, el valor medio de $C_{\text{máx}}$ de 100 en plasma fue de 1110~3664 ng/ml y el valor de $T_{1/2}$ en plasma fue de 0,31-2,20 h. El valor de $AUC_{\text{último}}$ en plasma fue de 695,8-7399,6 ng.h/ml, y el AUC aumentó proporcionalmente con el nivel de dosis de 100. Tras la administración IV única, 100 fue detectable en muestras de tejido hepático y cerebral. La concentración de 100 en las muestras de hígado fue mucho mayor que en las muestras de cerebro en el mismo punto de tiempo del muestreo, pero 100 en los tejidos hepáticos y cerebrales estaban ambos por debajo del límite de cuantificación 24 horas después de la administración IV. Tras la administración única IV de 100, el Endothal fue detectable y permaneció mucho tiempo en plasma y tejido hepático. Los valores medios de $C_{\text{máx}}$ en plasma e hígado fueron de 577-1230 ng/ml y 349-2964 ng/ml, respectivamente. Los valores de $AUC_{\text{último}}$ en plasma e hígado fueron de 546-4476 ng.h/ml y 2598-18434 ng.h/g, respectivamente. Los valores de $T_{1/2}$ en plasma e hígado fueron de 6,25-7,06 h y 4,57-10,1 h, respectivamente. Sin embargo, el Endothal no fue detectable en tejido cerebral.

30 **Tabla 10.1: Datos analíticos de la concentración de 100 en plasma (ng/ml) en ratas SD después de la administración IV.**

0,5 mg/kg				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	1000	1219	1110	154,68
1	192	103	148	62,78
2	25,8	19,4	22,6	4,58
6	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
10	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
24	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
1,0 mg/kg				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	2118	2648	2383	374,46
1	354	595	474	170,92
2	1030	239	634,4	559,22
6	3,27	BLQ	BLQ	N/A
10	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
24	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
1,5 mg/kg				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	3779	3548	3664	162,94
1	1758	2273	2015	364,20
2	1314	1104	1209	148,70
6	263	519	391	180,40
10	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
24	BLQ	BLQ	BLQ	N/A

35 **Tabla 10.2. Datos analíticos de la concentración de 100 en hígado (ng/g) en ratas SD después de la administración IV.**

0,5 mg/kg				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	520	651	586	92,76
1	695	223	459	333,91
2	109	148	128	27,06
6	BLQ	4,80	BLQ	N/A
10	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
24	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
1,0 mg/kg				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	1299	1442	1371	101,47
1	865	682	773	129,61
2	1318	398	858	650,73
6	13,9	5,73	9,83	5,81
10	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
24	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
1,5 mg/kg				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	1980	1709	1844	191,66
1	2144	2953	2548	571,97
2	2404	1585	1995	579,17
6	407	536	471	91,77
10	BLQ	5,25	BLQ	N/A
24	BLQ	BLQ	BLQ	N/A

Tabla 10.3: Datos analíticos de la concentración de 100 en cerebro (ng/g) en ratas SD después de la administración IV.

5

0,5 mg/kg				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	15,3	19,5	17,42	3,02
1	6,31	4,77	5,54	1,09
2	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
6	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
10	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
24	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
1,0 mg/kg				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	21,9	45,8	33,90	16,90
1	16,3	8,05	12,20	5,84
2	24,3	6,60	15,40	12,49
6	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
10	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
24	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
1,5 mg/kg				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	46,9	40,1	43,49	4,82
1	28,2	36,9	32,56	6,18
2	27,2	24,1	25,66	2,16
6	4,23	6,77	5,50	1,79
10	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
24	BLQ	BLQ	BLQ	N/A

Tabla 10.4: Datos analíticos de la concentración de Endothal en plasma (ng/g) en ratas SD después de la administración IV.

10

0,5 mg/kg Concentración de Endothal en plasma (ng/ml)				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	355	798	576	313,25
1	104	59,5	81,75	31,47
2	446	28,1	36,35	11,67
6	20,3	BLQ	20,3	N/A
10	48,1	25,3	36,70	16,12
24	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
1,0 mg/kg Concentración de Endothal en plasma (ng/ml)				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	1310	1150	1230	113,14
1	164	456	310	206,48
2	699	213	456	343,65
6	33,6	38,2	35,90	3,25
10	32,9	31,8	32,35	0,78
24	29,4	22,0	25,70	5,23
1,5 mg/kg Concentración de Endothal en plasma (ng/ml)				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	1610	745	1177	611,65
1	760	458	609	213,55
2	539	600	569,50	43,13
6	373	444	408,50	50,20
10	22,3	33,1	27,70	7,64
24	21,5	34,1	27,80	8,91

Tabla 10.5: Datos analíticos de la concentración de Endothal en hígado (ng/ml) en ratas SD después de la administración IV de 100.

5

0,5 mg/kg Concentración de Endothal en hígado (ng/g)				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	316	382	349	46,67
1	256	131	193,50	88,39
2	168	273	220,50	74,25
6	85,8	112	98,90	18,53
10	129	118	123,50	7,78
24	32,0	364	34,20	3,11
1,0 mg/kg Concentración de Endothal en hígado (ng/g)				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	768	1320	1044	390,32
1	1380	618	999	538,82
0	1530	542	1036	698,62
6	298	241	269,50	40,31
10	151	94,2	122,60	40,16
24	66,6	115	90,80	34,22
1,5 mg/kg Concentración de Endothal en hígado (ng/g)				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	2298	2160	2229	97,58
1	2874	2976	2925	72,12
2	2952	2226	2589	513,36
6	1686	1326	1506	254,56
10	137	329	233	135,76
24	75,0	52,1	63,55	16,19

Tabla 10.6: Datos analíticos de la concentración de Endothal en cerebro (ng/ml) en ratas SD después de la administración IV de 100.

0,5 mg/kg Concentración de Endothal en cerebro (ng/g)				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
1	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
2	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
6	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
10	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
24	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
1,0 mg/kg Concentración de Endothal en cerebro (ng/g)				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
1	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
2	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
6	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
10	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
24	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
1,5 mg/kg Concentración de Endothal en cerebro (ng/g)				
Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Media	DT
0,25	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
1	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
2	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
6	BLQ	BLQ	BLQ	N/A
24	BLQ	BLQ	BLQ	N/A

5

Tabla 10.7 Parámetros farmacocinéticos principales de 100 en ratas SD después de la administración IV.

Analito	Dosis de LB-100 (mg/kg)	Tejido	T _{1/2} (h)	T _{máx} (h)	Cmáx ng/ml o ng/g	AUC _{último} de ng.h/ml o de ng.h/g	AUC _{INF} de ng.h/ml o de ng.h/g	MRT (h)
0,5	100	Cerebro	/	0,25	174	10,8	/	/
		Hígado	0,78	0,25	586	758,6	902,2	1,17
		Plasma	0,31	0,25	1110	695,8	706,0	0,45
1,0	100	Cerebro	1,67	0,25	33,9	35,3	72,5	2,68
		Hígado	0,79	0,25	1371	3526,5	3537,7	1,51
		Plasma	0,99	0,25	2383	1923,5	2830,2	1,57
1,5	100	Cerebro	1,93	0,25	43,5	125,5	140,8	257
		Hígado	2,01	1,0	2548	9081,0	10449,1	2,90
		Plasma	2,20	0,25	3664	7399,6	8641,4	2,82

10 **Tabla 10.8: Parámetros farmacocinéticos principales de Endothal en ratas SD tras una sola administración IV de 100.**

Analito	Dosis de LB-100 (mg/kg)	Tejido	T _{1/2} (h)	T _{máx} (h)	C _{máx} ng/ml o ng/g	AUC _{último} de ng.h/ml o de ng.h/g	AUC _{INF} de ng.h/ml o de ng.h/g	MRT (h)
Endothal	0,5	Cerebro	/	/	/	/	/	/
		Hígado	10,1	0,25	349	2598	3095	7,90
		Plasma	6,65	0,25	577	546	828	2,96
	1,0	Cerebro	/	/	/	/	/	/
		Hígado	6,10	0,25	1425	6673	7370	6,14
		Plasma	7,06	0,25	1230	2487	2750	4,38
	1,5	Cerebro	/	/	/	/	/	/
		Hígado	4,57	0,25	2964	18434	18850	4,54
		Plasma	6,25	0,25	1178	4476	4730	4,57

Se midieron las concentraciones de Endothal de las 100 muestras de plasma y se calcularon los parámetros farmacocinéticos. LB100 se convirtió en Endothal.

5

Ejemplo 6. Administración del compuesto

Los Compuestos 100, 105, 113, 153 y 157 son inhibidores de PP2A. La presente invención desvela análogos de 100, 105, 113, 153 y 157, que son inhibidores de PP2A *in vitro* en células cancerosas humanas y en xenoinjertos de células tumorales humanas en ratones cuando se administran por vía parenteral en ratones. Estos compuestos inhiben el crecimiento de células cancerosas en sistemas modelo de ratón. Los análogos de 100, 105, 113, 153 y 157 se administran por vía intraperitoneal a ratones y se mide la actividad PP2A en el hígado y el cerebro. Los análogos de 100, 105, 113, 153 y 157 reducen la actividad PP2A en el hígado y el cerebro.

15 Se administra una cantidad de uno cualquiera de los compuestos de la presente invención a un sujeto afectado de cáncer cerebral. La cantidad del compuesto es eficaz para tratar al sujeto.

20 Se administra una cantidad de uno cualquiera de los compuestos de la presente invención a un sujeto afectado de glioma pontino intrínseco difuso. La cantidad del compuesto es eficaz para tratar al sujeto.

25 Se administra una cantidad de uno cualquiera de los compuestos de la presente invención a un sujeto afectado por glioma multiforme. La cantidad del compuesto es eficaz para tratar al sujeto.

30 Se administra una cantidad de uno cualquiera de los compuestos de la presente invención a un sujeto afectado de cáncer cerebral. La cantidad del compuesto es eficaz para atravesar la barrera hematoencefálica del sujeto y tratar al sujeto.

35 Se administra una cantidad de uno cualquiera de los compuestos de la presente invención a un sujeto afectado de glioma pontino intrínseco difuso. La cantidad del compuesto es eficaz para atravesar la barrera hematoencefálica del sujeto y tratar al sujeto.

40 Se administra una cantidad de uno cualquiera de los compuestos de la presente invención a un sujeto afectado por glioma multiforme. La cantidad del compuesto es eficaz para atravesar la barrera hematoencefálica del sujeto y tratar al sujeto.

45 Se administra una cantidad de uno cualquiera de los compuestos de la presente invención en combinación con un agente anticancerígeno a un sujeto afectado de cáncer cerebral. La cantidad del compuesto es eficaz para potenciar la actividad anticancerígena del agente anticancerígeno.

50 Se administra una cantidad de uno cualquiera de los compuestos de la presente invención en combinación con radiación ionizante, radiación x, docetaxel o temozolomida a un sujeto afectado de cáncer cerebral. La cantidad del compuesto es eficaz para potenciar la actividad anticancerígena de la radiación ionizante, radiación x, docetaxel o temozolomida.

Se administra una cantidad de uno cualquiera de los compuestos de la presente invención en combinación con un agente anticancerígeno a un sujeto afectado de glioma pontino intrínseco difuso o glioblastoma multiforme. La cantidad del compuesto es eficaz para potenciar la actividad anticancerígena del agente anticancerígeno.

50

Se administra una cantidad de uno cualquiera de los compuestos de la presente invención en combinación con radiación ionizante, radiación x, docetaxel o temozolomida a un sujeto afectado de glioma pontino intrínseco difuso o glioblastoma multiforme. La cantidad del compuesto es eficaz para potenciar la actividad anticancerígena de la radiación ionizante, radiación x, docetaxel o temozolomida.

5

Ejemplo 8. Profármacos de Endothal

Como se demuestra en los datos contenidos en el presente documento, los Compuestos 105, 113, 153 y 157 se metabolizan a Endothal *in vivo*. Los análogos de 105, 113, 153 y 157 contenidos en el presente documento también se metabolizan a Endothal *in vivo* y actúan como profármacos de Endothal. Los análogos del dímero Endothal contenidos en el presente documento también se metabolizan a Endothal *in vivo* y actúan como profármacos de Endothal.

Además, aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que los profármacos de la presente solicitud permiten el suministro dirigido de Endothal a células específicas, es decir, células cancerosas, en un sujeto. La administración directa de Endothal es indeseable debido a la toxicidad. Los profármacos proporcionan una absorción mejorada que conduce a una mayor biodisponibilidad del compuesto activo.

Se administra una cantidad de uno cualquiera de los compuestos de la presente invención a un sujeto afectado de cáncer. La cantidad del compuesto es eficaz para suministrar Endothal a las células cancerosas en el sujeto.

Se administra una cantidad de uno cualquiera de los compuestos de la presente invención a un sujeto afectado de cáncer cerebral. La cantidad del compuesto es eficaz para suministrar Endothal a las células de cáncer cerebral en el sujeto.

Se administra una cantidad de uno cualquiera de los compuestos de la presente invención a un sujeto afectado de glioma pontino intrínseco difuso o glioblastoma multiforme. La cantidad del compuesto es eficaz para suministrar Endothal a células de glioma pontino intrínseco difuso o células de glioblastoma multiforme en el sujeto.

Se administra una cantidad de uno cualquiera de los compuestos de la presente invención a un sujeto afectado de cáncer cerebral. La cantidad del compuesto es eficaz para suministrar Endothal a través de la barrera hematoencefálica del sujeto.

Ejemplo 9. Profármaco doble de Endothal/agente quimioterapéutico

Como se demuestra en los datos contenidos en el presente documento, los Compuestos 105, 113, 153 y 157 se metabolizan a Endothal *in vivo*. Los análogos de 105, 113, 153 y 157 contenidos en el presente documento también se metabolizan a Endothal *in vivo* y actúan como profármacos dobles de Endothal/agentes quimioterapéuticos. Los profármacos dobles contenidos en el presente documento también se metabolizan en Endothal *in vivo* y actúan como profármacos de Endothal. Sin embargo, el metabolismo del Endothal libera simultáneamente un agente quimioterapéutico.

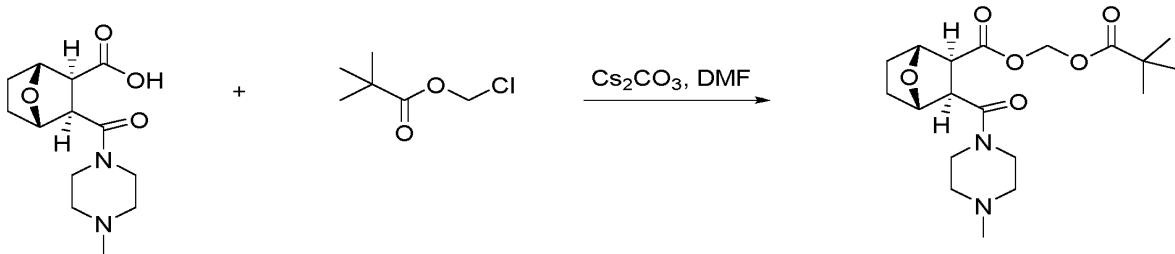
Además, aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que los profármacos dobles de la presente solicitud permiten el suministro dirigido de Endothal y un agente quimioterapéutico a células específicas, es decir, células cancerosas, en un sujeto. La administración directa de Endothal y/o un agente quimioterapéutico no es deseable debido a la toxicidad.

Además, aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que los profármacos dobles de la presente solicitud permiten el suministro dirigido de Endothal y un agente quimioterapéutico a células específicas, es decir, células cancerosas, en un sujeto. Asimismo, los profármacos dobles tienen la ventaja de tener dos compuestos bioactivos combinados en un fármaco (estructura novedosa). Esas estructuras solas tienen sus propias ventajas, por ejemplo, una absorción mejorada que conduce a una mayor biodisponibilidad de cualquiera de los componentes. Asimismo, la administración directa de Endothal y/o un agente quimioterapéutico podría ser indeseable debido a su toxicidad intrínseca.

55

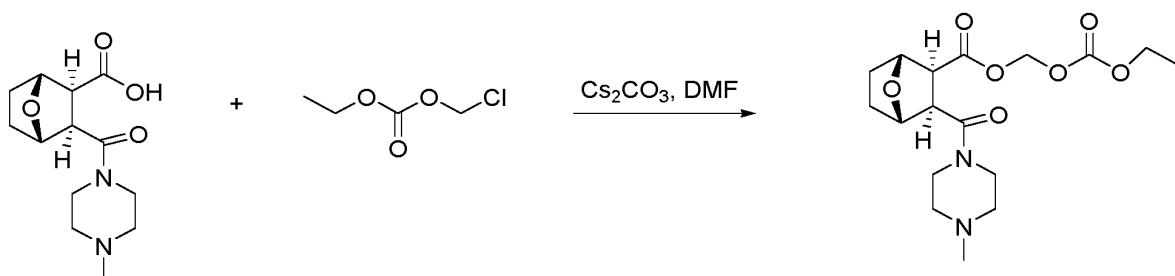
Ejemplo 10. Síntesis de éster de LB-100 POM y carbonato de LB-100

Éster de LB-100 POM



A una solución de LB-100 (106 mg, 0,4 mmol) en DMF (5 ml), se añadió Cs_2CO_3 (386 mg, 1,2 mmol) a temperatura ambiente. Tras agitar durante 5 min, se añade pivalato de clorometilo (178 mmg, 1,2 mmol). La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante la noche. Se añade agua (10 ml), se extrae la mezcla con acetato de etilo (5 x 10 ml). Se seca la fase orgánica sobre MgSO_4 , se filtra y se elimina el disolvente. Se titula el residuo con hexano y se filtra, dando un sólido blanco (103 mg, 68 % de rendimiento). RMN de ^1H (CDCl_3) 1,20 (s, 9H), 1,52 (d, 2H), 1,84 (d, 2H), 2,28-2,52 (m, 7H), 2,88 (d, 1H), 3,16 (d, 1H), 3,36-3,52 (m, 3H), 3,72 (m, 1H), 4,80 (s, 1H), 5,00 (s, 1H), 5,68 (d, 1H), 5,72 (d, 1H).

10 Carbonato de LB-100



15 A una solución de LB-100 (150 mg, 0,56 mmol) en DMF (5 ml), se añadió Cs_2CO_3 (546 mg, 1,7 mmol) a temperatura ambiente. Tras agitar durante 5 min, se añade etilcarbonato de clorometilo (232 mmg, 1,7 mmol). La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante la noche. Se añade agua (10 ml), se extrae la mezcla con acetato de etilo (5 x 10 ml). Se seca la fase orgánica sobre MgSO_4 , se filtra y se elimina el disolvente. Se titula el residuo con hexano y se filtra, dando un sólido blanco (124 mg, 60 % de rendimiento). RMN de ^1H (CDCl_3) 1,23 (t, 3H), 1,52 (d, 2H), 1,84 (d, 2H), 2,28-2,52 (m, 7H), 2,84 (d, 1H), 3,18 (d, 1H), 3,36-3,52 (m, 3H), 3,72 (m, 1H), 4,20 (c, 2H), 4,80 (s, 1H), 5,00 (s, 1H), 5,62 (d, 1H), 5,80 (d, 1H).

Ejemplo 12. Administración de carbonato de LB-100 o LB-100 POM

25 Se administra una cantidad de carbonato de LB-100 o LB-100 POM a un sujeto afectado de cáncer cerebral. La cantidad del compuesto es eficaz para tratar al sujeto.

Se administra una cantidad de carbonato de LB-100 o LB-100 POM a un sujeto afectado de glioma pontino intrínseco difuso. La cantidad del compuesto es eficaz para tratar al sujeto.

30 Se administra una cantidad de carbonato de LB-100 o LB-100 POM a un sujeto afectado de glioblastoma multiforme. La cantidad del compuesto es eficaz para tratar al sujeto.

35 Se administra una cantidad de carbonato de LB-100 o LB-100 POM a un sujeto afectado de cáncer cerebral. La cantidad del compuesto es eficaz para atravesar la barrera hematoencefálica del sujeto y tratar al sujeto.

Se administra una cantidad de carbonato de LB-100 o LB-100 POM a un sujeto afectado de glioma pontino intrínseco difuso. La cantidad del compuesto es eficaz para atravesar la barrera hematoencefálica del sujeto y tratar al sujeto.

40 Se administra una cantidad de carbonato de LB-100 o LB-100 POM a un sujeto afectado de glioblastoma multiforme. La cantidad del compuesto es eficaz para atravesar la barrera hematoencefálica del sujeto y tratar al sujeto.

Se administra una cantidad de carbonato de LB-100 o LB-100 POM en combinación con un agente anticancerígeno a un sujeto afectado de cáncer cerebral. La cantidad del compuesto es eficaz para potenciar la actividad anticancerígena del agente anticancerígeno.

45 Se administra una cantidad de carbonato de LB-100 o LB-100 POM en combinación con radiación ionizante, radiación x, docetaxel o temozolomida a un sujeto afectado de cáncer cerebral. La cantidad del compuesto es eficaz para potenciar la actividad anticancerígena de la radiación ionizante, radiación x, docetaxel o temozolomida.

Se administra una cantidad de carbonato de LB-100 o LB-100 POM en combinación con un agente anticancerígeno a un sujeto afectado de glioma pontino intrínseco difuso o glioblastoma multiforme. La cantidad del compuesto es eficaz para potenciar la actividad anticancerígena del agente anticancerígeno.

5 Se administra una cantidad de carbonato de LB-100 o LB-100 POM en combinación con radiación ionizante, radiación x, docetaxel o temozolomida a un sujeto afectado de glioma pontino intrínseco difuso o glioblastoma multiforme. La cantidad del compuesto es eficaz para potenciar la actividad anticancerígena de la radiación ionizante, radiación x, docetaxel o temozolomida.

10 **Ejemplo 13. Profármacos de carbonato de LB-100 y LB-100 POM**

Como se demuestra en los datos contenidos en el presente documento, el carbonato de LB-100 y el LB-100 POM se metabolizan a Endothal *in vivo* y actúan como profármacos de Endothal. Además, aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que los profármacos de la presente solicitud permiten el suministro dirigido de Endothal a células específicas, es decir, células cancerosas, en un sujeto. La administración directa de Endothal es indeseable debido a la toxicidad. Los profármacos proporcionan una absorción mejorada que conduce a una mayor biodisponibilidad del compuesto activo.

20 Se administra una cantidad de carbonato de LB-100 o LB-100 POM a un sujeto afectado de cáncer. La cantidad del compuesto es eficaz para suministrar Endothal a las células cancerosas en el sujeto.

Se administra una cantidad de carbonato de LB-100 o LB-100 POM a un sujeto afectado de cáncer cerebral. La cantidad del compuesto es eficaz para suministrar Endothal a las células de cáncer cerebral en el sujeto.

25 Se administra una cantidad de carbonato de LB-100 o LB-100 POM a un sujeto afectado de glioma pontino intrínseco difuso o glioblastoma multiforme. La cantidad del compuesto es eficaz para suministrar Endothal a células de glioma pontino intrínseco difuso o células de glioblastoma multiforme en el sujeto.

30 Se administra una cantidad de carbonato de LB-100 o LB-100 POM a un sujeto afectado de cáncer cerebral. La cantidad del compuesto es eficaz para suministrar Endothal a través de la barrera hematoencefálica del sujeto.

Ejemplo 14. Ensayos en hígado y sangre entera

35 Se evaluaron la estabilidad (sangre entera, S9 hepática, SGF, SIF y tampón PBS) y la permeabilidad de la monocapa a MDCK-MDR1 de LB100, carbonato de LB-100 y LB-100 POM.

Desarrollo de métodos analíticos

40 La señal de analito se optimizó para cada compuesto mediante el modo de ionización positiva o negativa de ESI. Se usó un barrido MS2 o un barrido SIM (*Selected Ion Monitoring*, monitoreo selectivo de iones) para optimizar la tensión del fragmentador y se usó un análisis de iones de producto para identificar el mejor fragmento para el análisis, y se optimizó la energía de colisión usando un barrido de iones de producto o MRM. Se asignó una clasificación de la ionización que indicaba la facilidad de ionización del compuesto.

45 3.3 Análisis de muestras (ensayos de estabilidad química, estabilidad de sangre entera y estabilidad de S9)

Análisis de muestras (ensayos de estabilidad química, estabilidad de sangre entera y estabilidad de S9)

50 Se analizaron las muestras mediante LC-MS/MS usando un espectrómetro de masas SCIEX QTrap 5500 acoplado con un HPLC Agilent 1290 serie Infinity, un automuestreador enfriado CTC PAL, todo controlado mediante el software Analyst. Tras la separación en una columna de HPLC de fase inversa C18 (Acquity UPLC HSS T3, 1,8, 2,1 x 50 mm) usando un sistema de gradiente de acetonitrilo-agua, se analizaron los máximos mediante espectrometría de masas (MS) usando ionización ESI en modo MRM.

55 **Análisis de muestras (ensayo de permeabilidad de MDCK-MDR1)**

Las muestras se analizaron mediante LC/MS/MS usando un espectrómetro de masas Xevo II acoplado con un HPLC Acquity y un automuestreador enfriado CTC PAL, todo controlado por MassLynx (Waters). Tras la separación en una columna de HPLC de fase inversa C18 (Waters Acquity UPLC HSS T3, 1,8 um, 1 x 50 mM) usando un sistema de gradiente de acetonitrilo-agua, se analizaron los máximos mediante espectrometría de masas (MS) usando ionización ESI en modo MRM.

Gradiente de HPLC (ensayos de estabilidad química, estabilidad de sangre entera y estabilidad de S9)

Tiempo (min)	Caudal (ml/min)	% de A Fase móvil	% de B Fase móvil
0,05	0,6	100	0
1,0	0,6	5	95
1,40	0,6	5	95
1,41	0,6	100	0
1,8	0,6	100	0

Solución A: H₂O con ácido fórmico al 0,1 %; Solución B: Acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 %

Gradiente de PLC (permeabilidad de MDCK-MDR1)

Tiempo (min)	Caudal (ml/min)	% de A Fase móvil	% de B Fase móvil
0,00	0,600	99,9	0,1
0,01	0,600	99,9	0,1
1,0	0,600	5	95
1,4	0,600	99,9	0,1
1,8	0,600	99,9	0,1

Solución A: H₂O con ácido fórmico al 0,1 %; Solución B: Acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 %

5

Estabilidad química: Condiciones experimentales

Artículo de prueba	Conc. de prueba	Condiciones de la prueba	Incubación	Compuestos de referencia	Método analítico
LB-151 Éster de LB-100 POM Carbonato de LB-100	5 µM	Tampón PBS (pH 7,4) SGF (pH 1,2) SIF (pH 6,5)	0, 1, 2 y 4 h (37 °C)	omeprazol warfarina	LC-MS/MS

10 Procedimiento experimental: Se incubó el compuesto por duplicado bien con tampón PBS (pH 7,4), SGF (pH 1,2) o SIF (pH 6,5) a 37 °C. En los puntos de tiempo indicados, se retiró una alícuota de cada reacción experimental y se mezcló con tres volúmenes de solución de parada enfriada con hielo (metanol que contenía propranolol/diclofenaco/bucetina como patrones analíticos internos). Se incubaron las reacciones detenidas durante diez minutos a -20 °C. Las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se analizaron mediante LC/MS/MS para cuantificar el precursor restante, así como la formación de metabolitos. Se convirtieron los datos en el % restante dividiendo entre el valor de la concentración en el punto de tiempo cero. Se ajustaron los datos a un modelo de descomposición de primer orden para determinar la semivida.

15

Estabilidad de S9 hepática: Condiciones experimentales

20 Procedimiento experimental: Se incuba el agente de prueba por duplicado con S9 hepática a 37 °C. La reacción contiene proteína S9 hepática en fosfato de potasio 100 mM, NADPH 2 mM, MgCl₂ 3 mM, pH 7,4. Se ejecuta un control para cada agente de prueba, omitiendo NADPH para detectar la degradación libre de NADPH. En los puntos de tiempo indicados, se retira una parte alícuota de cada reacción experimental y de control, y se mezcla con un volumen igual de solución de parada enfriada con hielo (metanol, que contenía propranolol como patrón interno). Se incuban las reacciones detenidas durante 10 minutos a -20 °C. Se centrifugan las muestras para eliminar la proteína precipitada, y los sobrenadantes se analizan mediante LC/MS/MS para cuantificar el precursor restante y la formación de metabolitos. Los datos se presentan como el % restante dividiendo entre el valor de concentración del punto de tiempo cero.

25

Artículo de prueba	Conc. de prueba	Especie de S9	Conc. de proteína	Incubación	Compuesto de referencia	Método analítico
LB-151 Éster de LB-100 POM Carbonato de LB-100	1 μ M	Rata, mono y ser humano	1,0 mg/ml	0, 1, 2 y 4 h (37 °C)	verapamil warfarina	LC-MS/MS

Estabilidad de sangre entera: Condiciones experimentales

- 5 **Procedimiento experimental:** Se diluyó la solución madre primero en acetonitrilo a una concentración 100 veces la concentración final deseada. Se incubó por duplicado con sangre entera a 37 °C. En los puntos de tiempo indicados, se retiró una alícuota de cada reacción experimental y de control, y se mezcló con tres volúmenes de solución de parada enfriada con hielo (metanol que contenía propranolol como patrón interno). Se incubaron las reacciones detenidas al menos diez minutos a -20 °C. Se centrifugaron las muestras para eliminar la proteína precipitada, y los sobrenadantes se analizaron mediante LC-MS/MS para cuantificar el precursor restante y la formación de metabolitos.
- 10 Se convirtieron los datos en el % restante dividiendo entre el valor de la concentración en el punto de tiempo cero. Se ajustaron los datos a un modelo de descomposición de primer orden para determinar la semivida.

15

Artículo de prueba	Conc. de prueba	Especie	Incubación	Método analítico
LB-151 Éster de LB-100 POM Carbonato de LB-100	5 μ M	rata, perro, mono y ser humano	0, 1, 2 y 4 h (37 °C)	LC-MS/MS

15

Permeabilidad de MDCK-MDR1: Condiciones experimentales

- 20 **Procedimiento experimental:** Se sometieron a tripsinización células MDCK-CDR1 cultivadas en matraces de cultivo titular, se suspendieron en medio, y las suspensiones se aplicaron a los pocillos de una placa Millipore de 96 pocillos. Se permitió el crecimiento y la diferenciación de las células durante tres semanas, con alimentación a intervalos de 2 días. Para la permeabilidad apical a basolateral (A → B), se añade el agente de prueba al lado apical (A) y se determina la cantidad de permeación en el lado basolateral (B); para la permeabilidad basolateral a apical (B → A), se añade el agente de prueba al lado B y se determina la cantidad de permeación en el lado A. El tampón del lado A contiene tinte amarillo Lucifer a 100 μ M, en tampón de transporte (glucosa a 1,98 g/l en HEPES 10 mM, 1 x solución salina equilibrada de Hank) pH 7,4, y el tampón del lado B es tampón de transporte a pH 7,4. Se incubaron células MDCK-MDR1 con estos tampones durante 2 h, y el tampón del lado del receptor se retiró para el análisis por LC/MS/MS (usando propranolol como patrón analítico interno). Para verificar que las monocapas de células MDCK-MDR1 estaban formadas correctamente, se analizaron partes alícuotas de los tampones celulares mediante fluorescencia para determinar el transporte del tinte impermeable amarillo Lucifer. Se presenta cualquier desviación de los valores de control.
- 25
- 30

Desarrollo del método de espectrometría de masas: MS/MS

- 35 Se observaron los metabolitos de LB-151 (LB-100, Endothal y metiléster de Endothal), Carbonato de LB-100 (LB-100 y Endothal) y LB-100 POM (LB-100 y Endothal).

Artículo de prueba	PM	Polarización de la ESI	<i>m/z</i> del precursor	<i>m/z</i> del producto	Clasificación de la ionización
LB-151	282,34	positiva	283,15	251,153	1
Éster de LB-100 POM	382,46	positiva	383,196	251,17	1
Carbonato de LB-100	370,4	positiva	371,153	251,137	1

Metabolitos observados					
LB-100	268,31	positiva	269,171	251,138	1
Endothal	186,16	negativa	184,986	140,92	1
Metiléster de Endothal	200,19	negativa	198,94	110,89	1

1 = altamente ionizable, 2 = intermedio, 3 = poco ionizable *m/z*: porcentaje de la masa con respecto a la carga del analito

En el estudio de estabilidad de la S9 hepática, se observaron los metabolitos LB-100 y Endothal tanto en el carbonato de LB-100 como en el éster de LB-100 POM en presencia y ausencia de NADPH (especies cruzadas), lo que sugiere que estos metabolitos fueron formados por enzimas no dependientes de NADPH (por ejemplo, esterasas y amidasas).

5 No se observaron metabolitos en las muestras de LB-151 (véase la Figura 5). Se estudiaron los metabolitos de carbonato de LB-100 y éster de LB-100 POM en rata, perro, mono y ser humano (véase la Figura 6).

En el estudio de la semivida en sangre entera, se observó la formación de Endothal y LB-100 en el carbonato de LB-100 y el éster de LB-100 POM (especies cruzadas). No se detectaron metabolitos en LB-151 (véase la Figura 7). En 10 el estudio de los metabolitos en sangre entera, el carbonato de LB-100 y el éster de LB-100 POM se metabolizaron en Endothal y LB-100 en rata, perro, mono y ser humano (véase la Figura 8).

En el estudio de permeabilidad de MDCK-MDR1, no se observaron metabolitos en todas las muestras (véase la Figura 15 9).

Análisis

La inhibición de PP2A interfiere en múltiples aspectos de los mecanismos de reparación de daños en el ADN (DDR, 20 DNA Damage Repair) y con la salida de la mitosis. Estos mecanismos sensibilizan las células cancerosas a los tratamientos contra el cáncer que causan una lesión aguda del ADN. El Compuesto 100 (véase la publicación de patente de EE. UU. n.º 7.998.957 B2) tiene actividad anticancerígena cuando se usa solo (Lu *et al.* 2009a) y se potencia 25 significativamente *in vivo*, sin aumento observable de la toxicidad, la actividad antitumoral de los fármacos anticancerígenos citotóxicos convencionales, incluyendo la temozolomida (Lu *et al.* 2009b, Martinova *et al.* 2010), la doxorubicina (Zhang *et al.* 2010) y el docetaxel. 100 fue aprobado recientemente para la evaluación clínica de Fase I solo y en combinación con docetaxel, y está en ensayo clínico.

El Compuesto 100 es un inhibidor de la serina-treonina fosfatasa que potencia la actividad de los fármacos quimioterapéuticos convencionales y la radiación. El mecanismo de potenciación es el deterioro de múltiples etapas de un proceso de reparación del daño del ADN y la inhibición de la salida de la mitosis. Se ha demostrado que el 30 Compuesto 100 potencia la actividad de la temozolomida, la doxorubicina, el taxotere y la radiación contra una variedad de estirpes celulares de cáncer humano que crecen como xenoinjertos subcutáneos. El tratamiento con el Compuesto 100 produce un factor de potenciación de la dosis de radiación de 1,45. Se trajeron ratones portadores de xenoinjertos subcutáneos (sc) de células GBM humanas U251 con el Compuesto 100 por vía intraperitoneal junto con radiación, cada uno dado diariamente durante 5 días x 3 cursos. La combinación fármaco/radiación no fue más tóxica 35 que la radiación sola, y eliminó el 60 % de los xenoinjertos (6 meses más seguimiento). El 40 % restante de los xenoinjertos tratados con la combinación reaparecieron dos meses más tarde que los xenoinjertos tratados solo con radiación. Wei *et al.* (2013) mostraron que la inhibición de PP2A por el Compuesto 100 potenció la eficacia de la radiación dirigida para inhibir el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de páncreas humano en un modelo animal. Por 40 lo tanto, 100 parecería ser un agente ideal para combinar con la radiación para tratar cánceres localizados tales como los tumores cerebrales.

El Compuesto 100 es muy eficaz contra los xenoinjertos de gliomas humanos en combinación con la temozolomida y/o la radiación. El Compuesto 100, que tiene una IC_{50} de 1-3 μ M para un amplio espectro de estirpes celulares de cáncer humano, es un zwitterión altamente hidrosoluble que no atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica (BHE) 45 según lo determinado en ratas y primates no humanos. Se realizaron estudios toxicocinéticos de GLP del Compuesto 100 administrado por vía intravenosa diariamente x 5 días en ratas y perros. Se espera que las principales toxicidades esperadas a dosis clínicamente tolerables que se espera que inhiban la enzima diana, PP2A, *in vivo* (3-5 mg/m²) sean cambios reversibles microscópicos del túbulos proximal renal y alteraciones microscópicas en las células epicárdicas. Es interesante que la fostriecina, un inhibidor selectivo de productos naturales de PP2A, se evaluó administrada por 50 vía intravenosa diariamente durante 5 días en ensayos de fase I hace varios años. No se alcanzó la toxicidad limitante de la dosis antes de finalizar los estudios por falta de un suministro fiable de fármaco. En esos estudios, las principales toxicidades fueron aumentos reversibles no acumulativos de la creatinina en suero y de enzimas hepáticas.

El Compuesto 100 se considera estable con respecto al verapamil en presencia de microsomas de ratón, rata, perro, 55 mono y ser humano. El Compuesto 100 se absorbe mal o se descompone en el intestino, de modo que queda poco en el plasma después de la administración oral. En estudios de GLP en la rata Sprague Dawley macho y hembra, los parámetros PK para el Compuesto 100 administrado por bolo IV lento diariamente x 5 días también fueron dependientes de la dosis y comparables el día 1 y el día 4. Los valores para las ratas hembra después del fármaco a 0,5, 0,75 y 1,25 mg/kg en el día 4 fueron respectivamente: C_0 (ng/ml) 1497, 2347 y 3849;

60 AUC_{último} (ng.h/ml) 452, 691 y 2359; AUC_{último} de SC (ng.h/ml) 17,7, 54,0 y 747; AUC_{último} de DN 904, 921 y 1887; AUC* (ng.h/ml) 479, 949 y 2853; % de AUC* extrapolado 5,6, 27 y 17; $T_{1/2}$ (h) 0,25, 0,59 y 1,8; Cl (ml/h/kg) 1045, 790, 438 (MACHO 1071, 1339, 945); V_z (ml/kg) 378, 677 y 1138. En estudios de GPL en perros macho y hembra, los parámetros toxicocinéticos para el Compuesto 100 administrado por vía intravenosa durante 15 minutos diarios 65 durante 5 días fueron dependientes de la dosis y comparables en el día 1 y el día 4. Los valores para los perros hembra después del fármaco a 0,15, 0,30 y 0,50 mg/kg en el día 4 fueron respectivamente: C_0 (ng/ml) 566, 857 y 1930;

AUC_{último} (ng.h/ml) 335, 1020 y 2120; C_{máx} (ng/ml) 370, 731, 1260; T_{máx} (h) 0,25, 0,35 y 0,25; y T_{1/2} (h) 0,47, 0,81 y 1,2 (IND n.º 109.777: Compuesto 100 para inyección). Se ha demostrado que la inhibición de la abundante PP2A en los glóbulos blancos circulantes (aislados mediante Ficoll-Hypaque) es dependiente de la dosis en la rata después de una administración IV lenta de 100 a 0,375, 0,75 y 1,5 mg/kg, lo que resulta en el 9, 15 y 25 % de inhibición, respectivamente.

5 El metiléster de 100, el Compuesto 151, que tiene una biodisponibilidad oral de aproximadamente el 60 % frente al 10 % para el Compuesto 100, se dio por vía oral a las ratas. El tratamiento con el Compuesto 151 produjo niveles sustanciales de Compuesto 100 en el plasma con una semivida aparentemente mucho mayor en comparación con 100 dado por vía intravenosa.

10 Basándose en los datos contenidos en los Ejemplos 8-11, los Compuestos 105, 113, 153 y 157 se convierten en 15 Endothal en el plasma cuando se administran a ratas. Por consiguiente, los Compuestos 105, 113, 151, 153 y 157, y derivados de los mismos son útiles como profármacos de Endothal. Los compuestos de la presente solicitud contienen 20 diferentes sustituyentes que se escinden *in vivo* cuando se administran a un sujeto, liberando así el Endothal. Estos compuestos contienen grupos X o Y que se escinden más eficazmente *in vivo*.

25 El glioma pontino intrínseco difuso (DIPG) es un tumor cerebral uniformemente mortal en niños para el que no existe 30 un tratamiento convencional que no sea radiación. Los neurooncólogos pediátricos creen que es apropiado tratar incluso a pacientes no tratados previamente con un protocolo de investigación que ofrezca un nuevo enfoque. No ha 35 habido avances en la supervivencia general en pacientes con GlioBlastoma Multiforme (GBM) desde la mejora definitiva, pero marginal, mostrada hace años por la adición de temozolomida a la radiación tras la cirugía. El GBM recurrente se suele tratar con Avastina como terapia de segunda línea, pero después de una recaída tras la Avastina, el tratamiento experimental es el convencional. Es de interés sobre la inhibición de PP2A en tumores cerebrales el reciente informe de que hay niveles elevados de PP2A en el GBM y que los pacientes con los niveles más altos de 40 PP2A en sus gliomas tienen el peor pronóstico (Hoffstetter *et al.*, 2012).

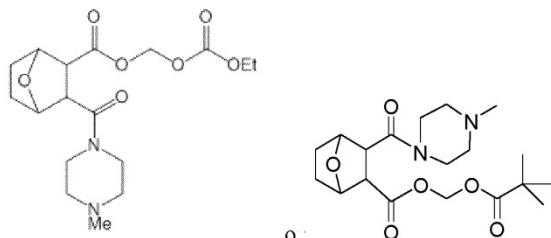
Como se muestra en los estudios PK y PD presentados en el presente documento, el LB-100 entra en los tejidos y se convierte en parte en Endothal en los tejidos. Como inhibidor de la proteína diana purificada de LB-100, la proteína fosfatasa PP2A, el Endothal es potente con una IC₅₀ de ~90 nM. *In vivo*, el Endothal tiene una semivida más larga que LB-100 en el orden de 6 horas en comparación con aproximadamente 1 hora o menos para LB-100. Por lo tanto, LB-100 es un agente anticancerígeno activo tanto por sí mismo como por su conversión *in vivo* en Endothal, y aumenta la duración eficaz de la inhibición de la diana deseada, PP2A, en el tejido. Una semivida de varias horas de actividad es clínicamente más deseable que duraciones mucho más cortas. La modificación de los sustituyentes de LB-100 45 proporciona oportunidades para potenciar aún más la utilidad clínica de LB-100, por ejemplo, mejorando la absorción oral, la captación en órganos específicos portadores del proceso patológico, por ejemplo, el cerebro, y modificando aún más la tasa de conversión para el suministro eficaz del compuesto precursor y/o Endothal al tejido.

Referencias

- 40 Bastien *et al.* (2004) *Gene*, Vol. 328, pág. 1-16.
 Giannini, R. y Cvallini, A. (2005) *Anticancer Research* Vol. 36, N.º 6B, pág. 4287-4292.
 Graziano, M. J. y Casida, J. E. (1987) *Toxicol Lett.* 37, 143-148.
 Havrilesky, L. J. *et al.* (2001) *J. Soc. Gynecol. Investig.* Vol. 8, pág. 104-113.
 45 Hawkins C. E. *et al.* (2011) *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 29, No. 30, 3954-3956.
 Hermanson *et al.* (2002) *Nature*, Vol. 419, pág. 934-939.
 Hofstetter C. P. *et al.* (2012) *PLoS ONE* 7(1):1-11.
 Honkanan, R. E. *et al.* (1993) *FEBS Lett.* 330, 283-286.
 50 Li, Y. M. *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 89, 11867-11870.
 Li, Y. M. *et al.* (1993) *Biochem. Pharmacol.* 46, 1435-1443.
 Lu J. *et al* (2009a) *J Neurosurgery* Vol. 113, No. 2, páginas 225-233.
 Lu J. *et al* (2009b) *PNAS* 106(28), 11697-11702.
 Martinova L. *et al* (2011) *PLoS ONE* 6(2):1-8.
 Myers, E. *et al.* (2005) *Clin. Cancer Res.* Vol. 11, pág. 2111-2122.
 55 Park D. M. *et al* (2007) *Cell Cycle* 6(4):467-470.
 Stupp R. *et al* (2009) *Lancet Oncol* 10:459-466.
 Thiery J. P., *et al.* (1999) *Hepatology*, 29, 1406-17.
 Tsauer, W. *et al.* (1997) *Anticancer Research* 17, 2095-2098.
 Wang, D. S. (1989) *Journal of Ethnopharmacology* 26,147-162.
 60 Warren K. *et al* (2012) *Cancer* 118:3607-3613.
 Waters, C. E. *et al.* (2004) *J. Endocrinol.* Vol. 183, pág.375-383.
 Wei *et al* (2013) *Clin. Cancer Res.* 19, 4422-4432.
 Ynag, Y. *et al.* (2011) *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 1(3), 143-159.
 Zhang C. *et al* (2010) *Biomaterials* 31, 9535-9543.
 65 Zhuang Z. *et al* (2009) *Cell Cycle* 8(20):3303-3306.

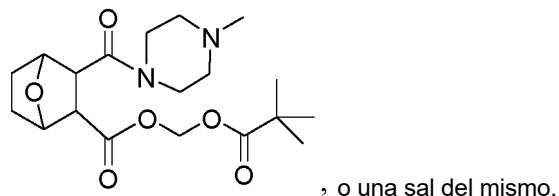
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la estructura



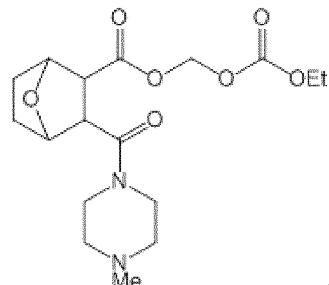
5 o una sal del compuesto.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde dicho compuesto es:



, o una sal del mismo.

10 3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde dicho compuesto es:



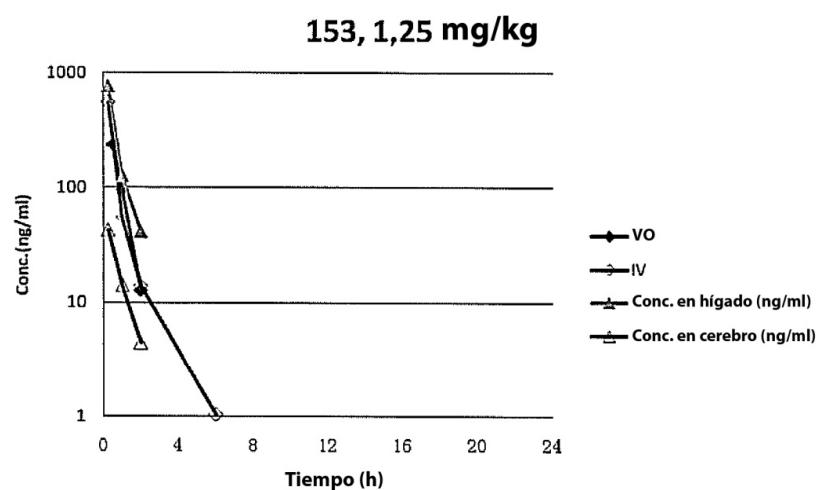
, o una sal del mismo.

15 4. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 5. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un agente anticancerígeno, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3 para su uso como profármaco de Endothal.

A.



B.

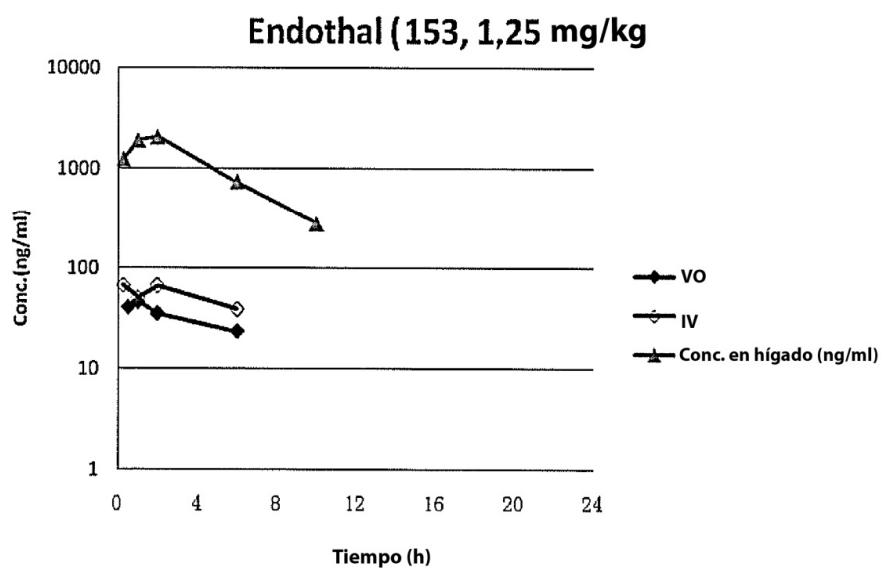
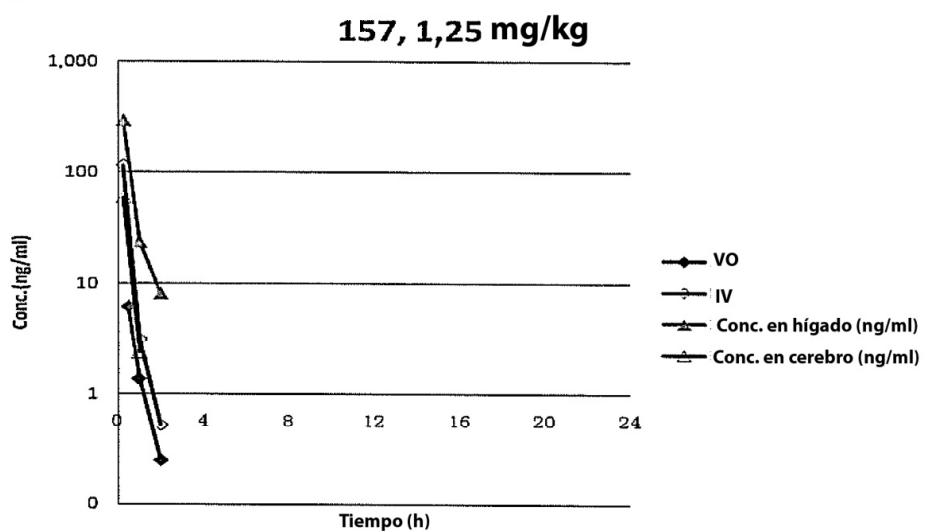


Fig. 1A-B

C.



D.

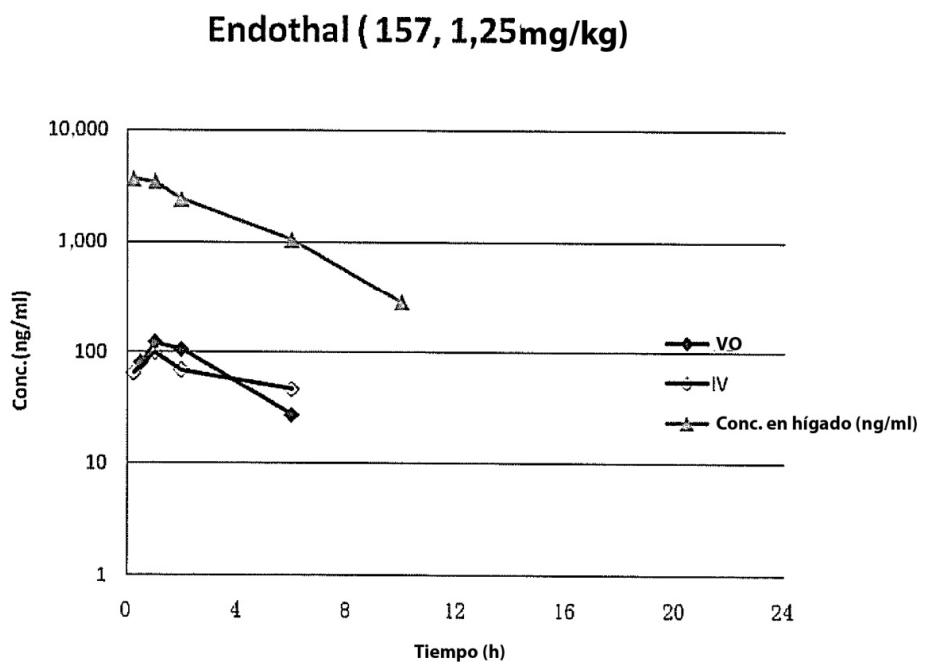
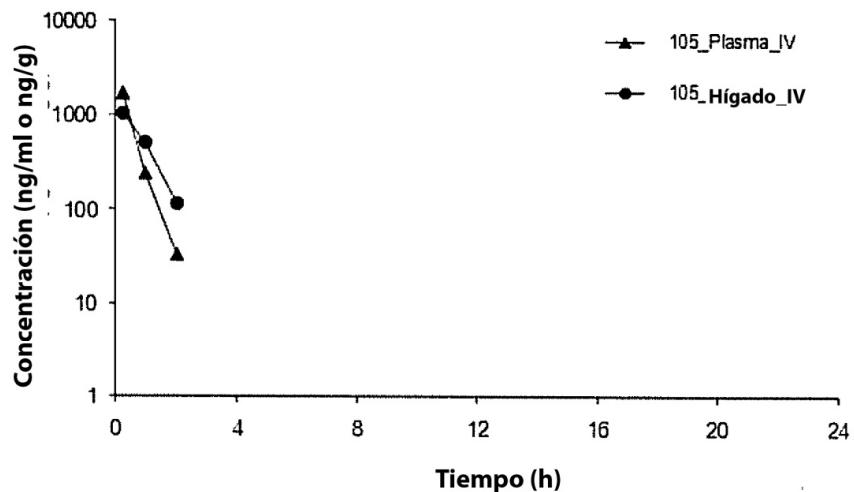


Fig. 1C-D

A.



B.

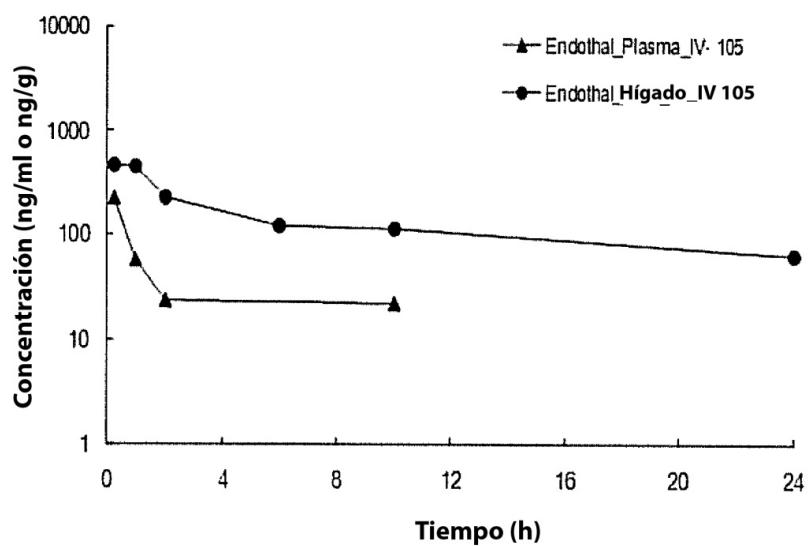


Fig. 2A-B

C.

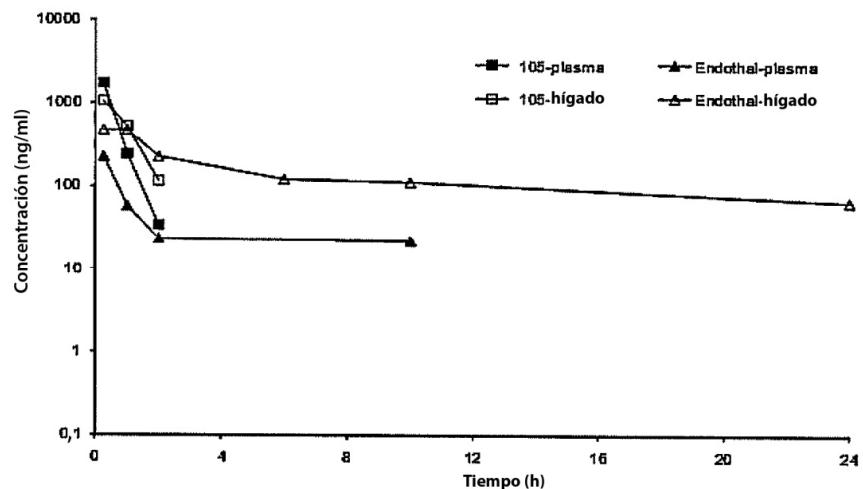


Fig. 2C

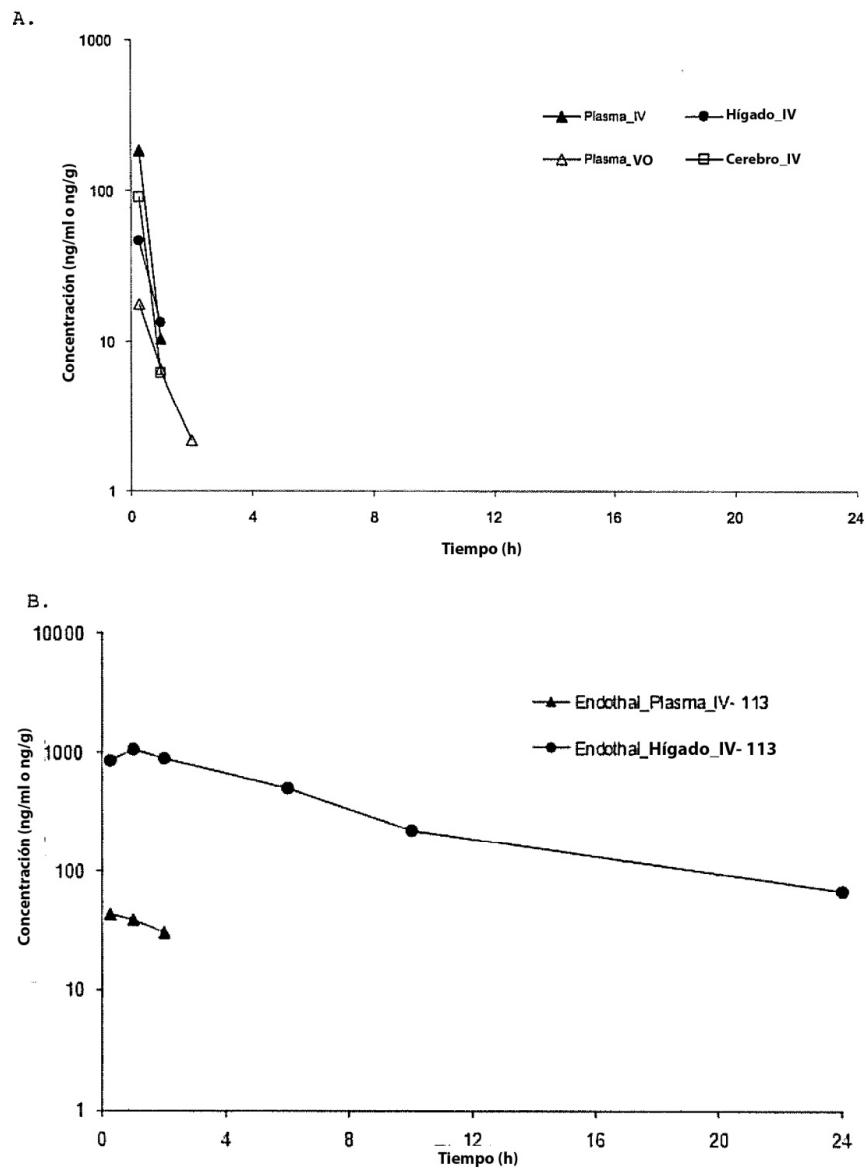
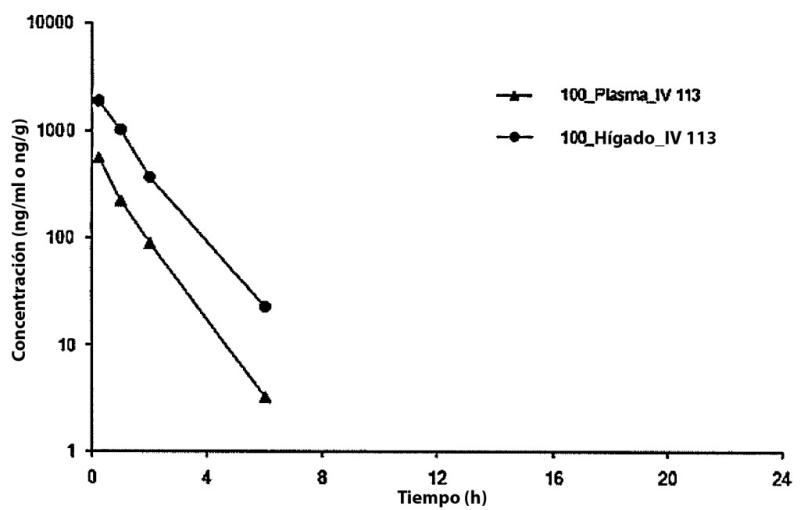


Fig. 3A-B

C.



D.

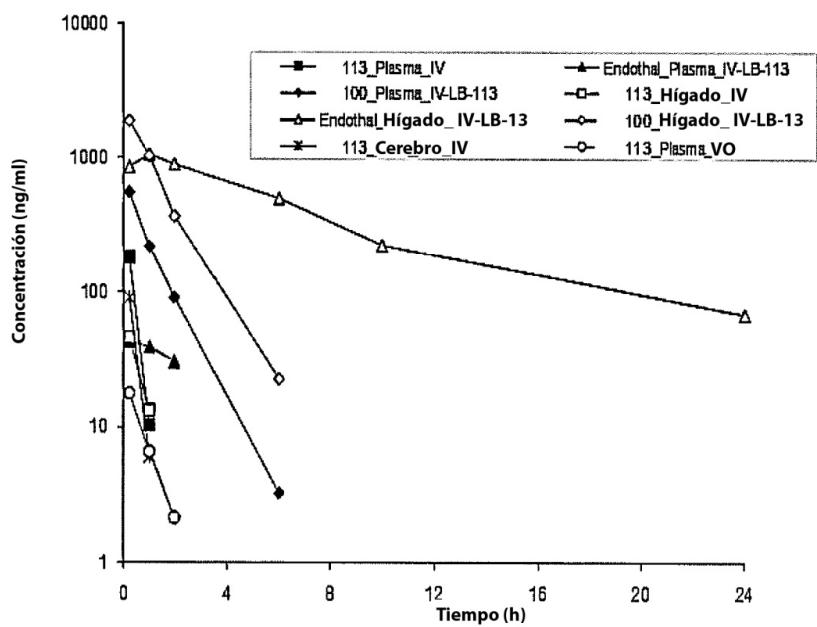


Fig. 3C-D

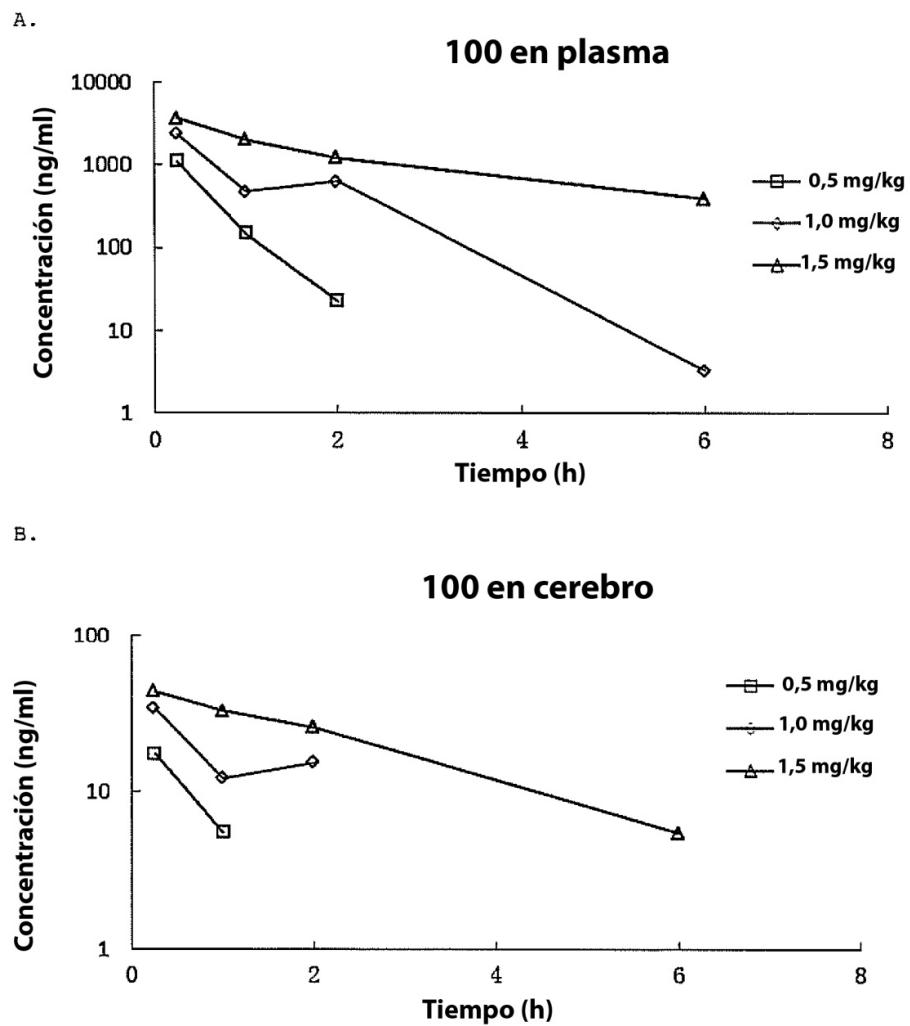
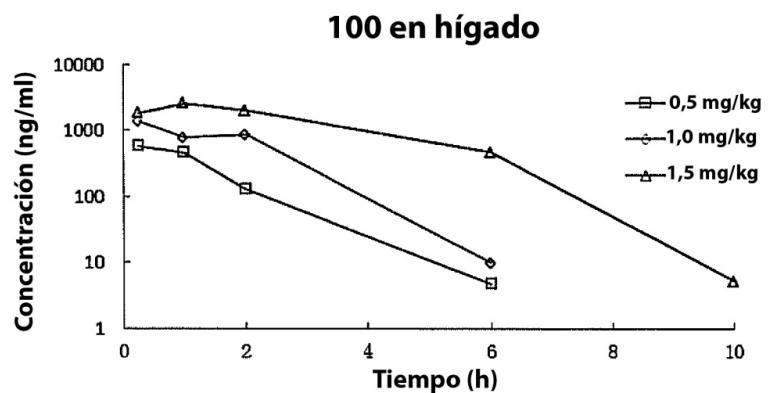


Fig. 4A-B

C.



D.

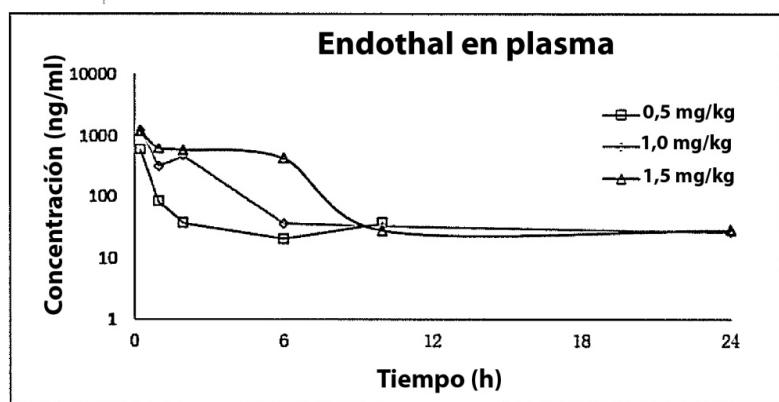


Fig. 4C-D

E.

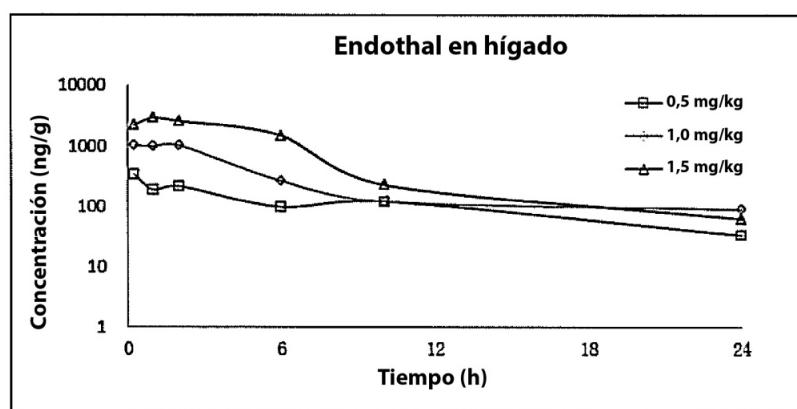
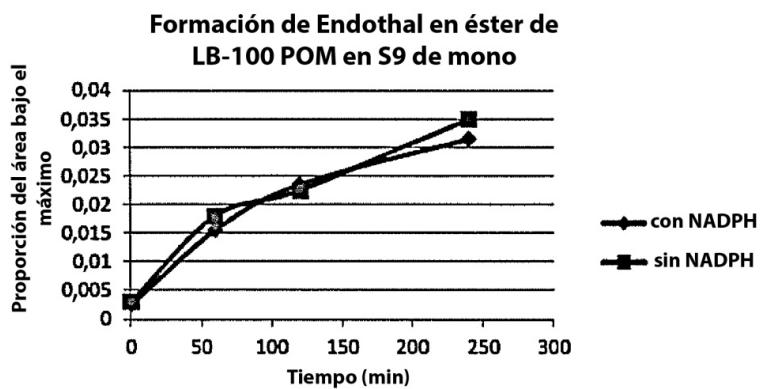


Fig. 4E

Artículo de prueba	Especie	CL _{último} dependiente de NADPH (μl min ⁻¹ mg ⁻¹)	T _{1/2} dependiente de NADPH (min)	CL _{último} libre de NADPH (μl min ⁻¹ mg ⁻¹)	T _{1/2} libre de NADPH (min)	Comentario
verapamil	Rata	26,8	25,9	~0,72	~960	Control de alto aclaramiento
	Ser humano	14,3	48,6	~0,72	~960	
	Mono	89,2	7,77	~0,72	~960	
warfarina	Rata	~0,72	~960	~0,72	~960	Control de bajo aclaramiento
	Ser humano	~0,72	~960	~0,72	~960	
	Mono	~0,72	~960	~0,72	~960	
LB-151	Rata	~0,72	~960	~0,72	~960	
	Ser humano	0,8	831	1,2	562	
	Mono	~0,72	~960	~0,72	~960	
Éster de LB-100 POM	Rata	13,7	50,8	10,0	69,3	
	Ser humano	10,0	69,2	10,7	64,5	
	Mono	113,3	6,1	108	6,4	
Carbonato de LB-100	Rata	12,2	56,8	12,6	55,0	
	Ser humano	7,75	89,5	9,66	71,7	
	Mono	39,7	17,5	48,2	14,4	

Fig. 5

A.



B.

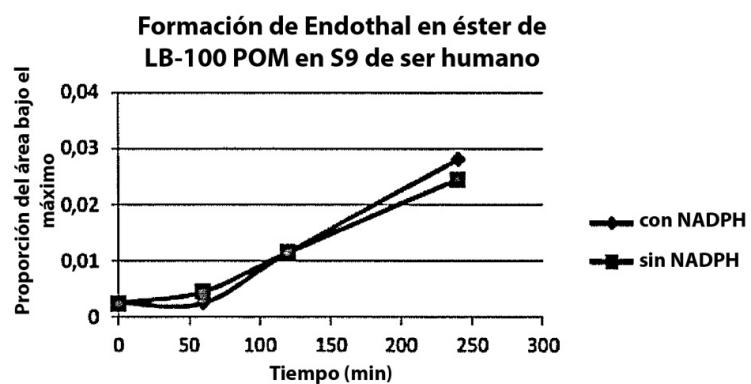
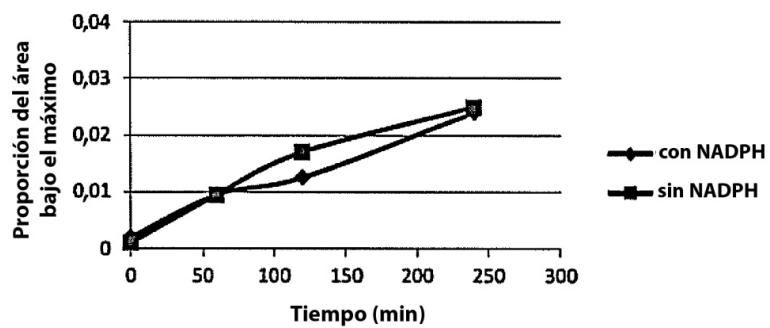


Fig. 6A-6B

C.

**Formación de Endothal en éster de LB-100 POM
en S9 de rata**



D.

**Formación de Endothal en carbonato de LB-100
en S9 de mono**

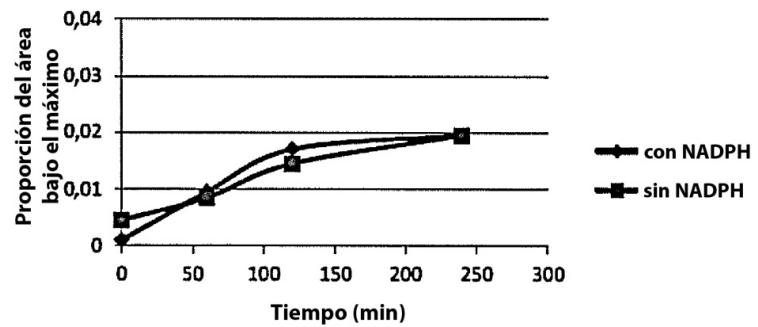
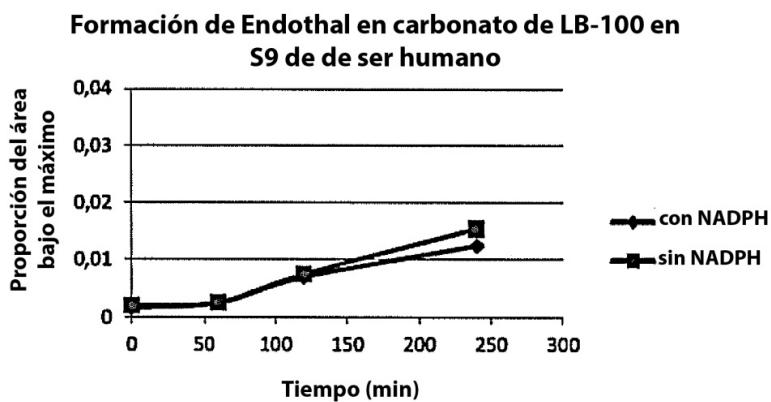


Fig. 6C-6D

E.



F.

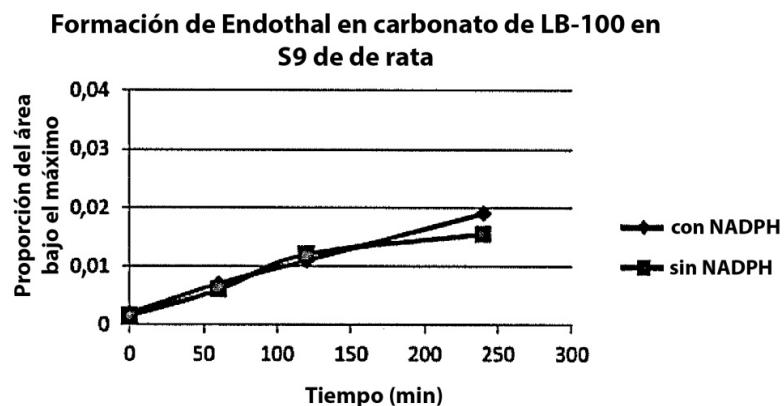
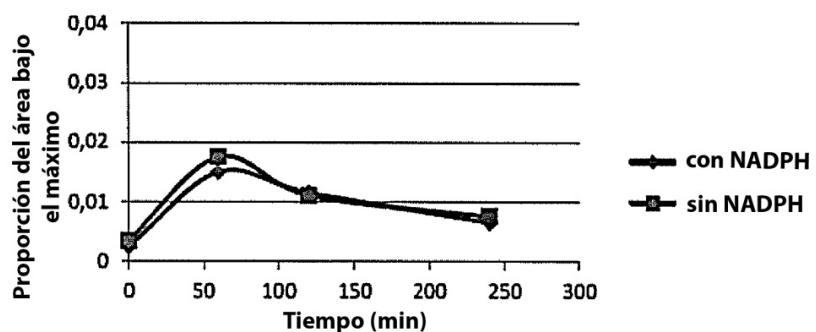


Fig. 6E-6F

G.

**Formación de LB-100 en éster de LB-100 POM
en S9 de mono**



H.

**Formación de LB-100 en éster de LB-100 POM
en S9 de ser humano**

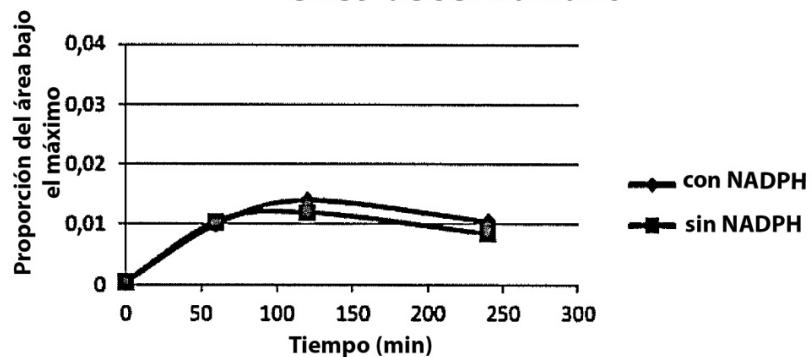
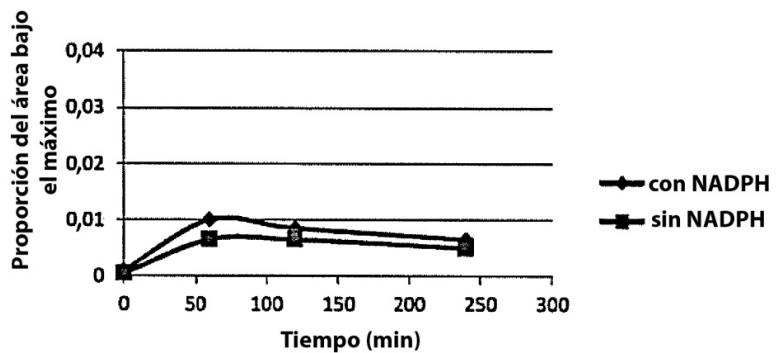


Fig. 6G-6H

I.

**Formación de LB-100 en éster de
LB-100 POM en S9 de rata**



J.

**Formación de LB-100 en carbonato de
LB-100 en S9 de mono**

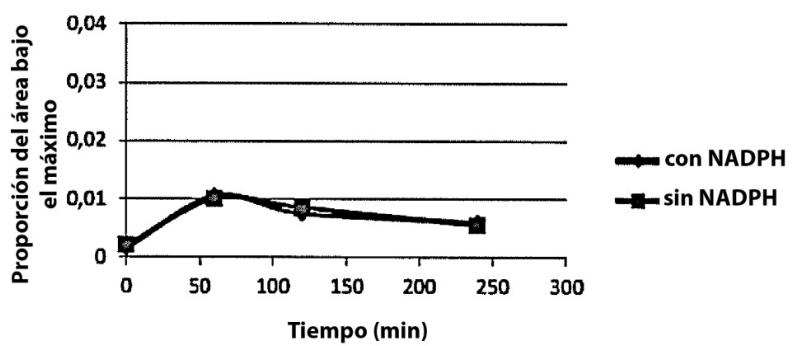
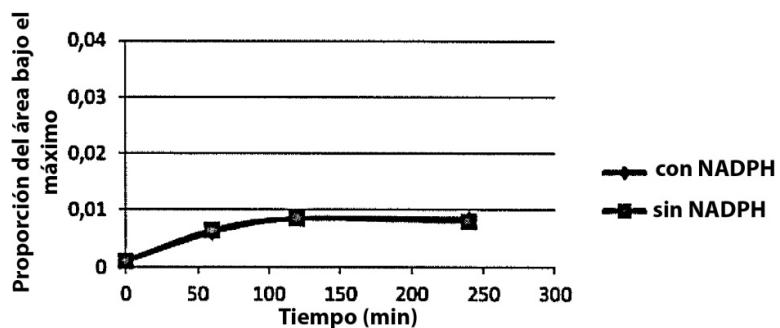


Fig. 6I-6J

K.

**Formación de LB-100 en carbonato de
LB-100 en S9 de ser humano**



L.

**Formación de LB-100 en carbonato de
LB-100 en S9 de rata**

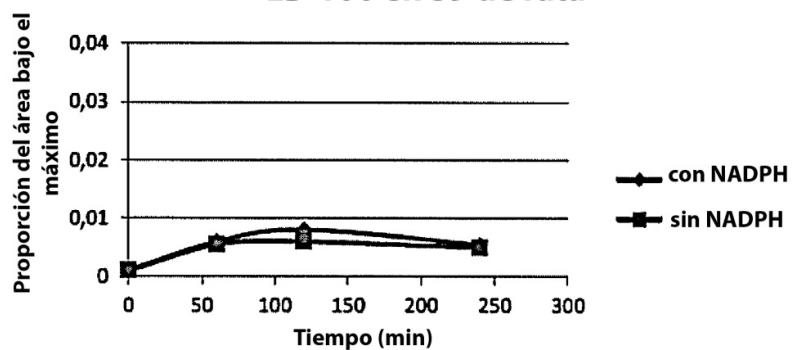


Fig. 6K-6L

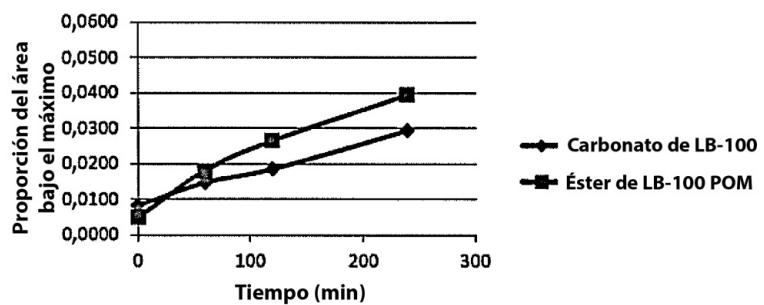
Artículo de prueba	Especie	T _{1/2} (min)	% de precursor restante en el último punto de tiempo (240 min)	Comentario
Propantelina	Perro	157	43,8	Control de alto CLint
Propantelina	Ser humano	61	9,2	
Propantelina	Mono	52	7,5	
Enalapril	Rata	20,9	0,0	
Carbonato de LB-100	Perro	9,0	0,0	
	Ser humano	9,0	0,0	
	Mono	9,0	0,0	
	Rata	9,0	0,0	
Éster de LB-100 POM	Perro	20,6	0,0	
	Ser humano	7,7	0,0	
	Mono	6,1	0,0	
	Rata	14,2	0,0	
LB-151	Perro	536	76,8	
	Ser humano	958	82,0	
	Mono	547	76,8	
	Rata	197	45,3	

T_{1/2}: Semivida

Fig. 7

A.

**Formación de Endothal en sangre entera
de perro**



B.

**Formación de Endothal en sangre entera
de ser humano**

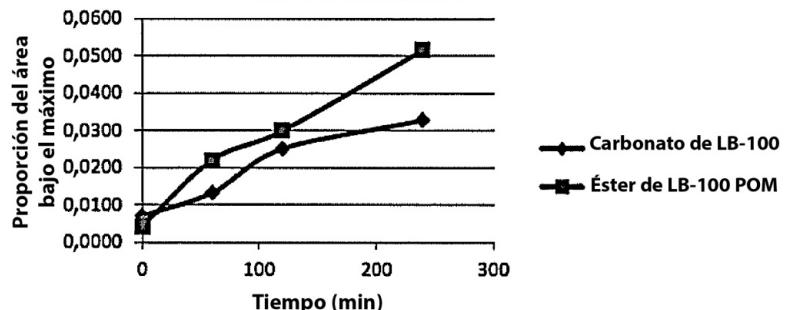
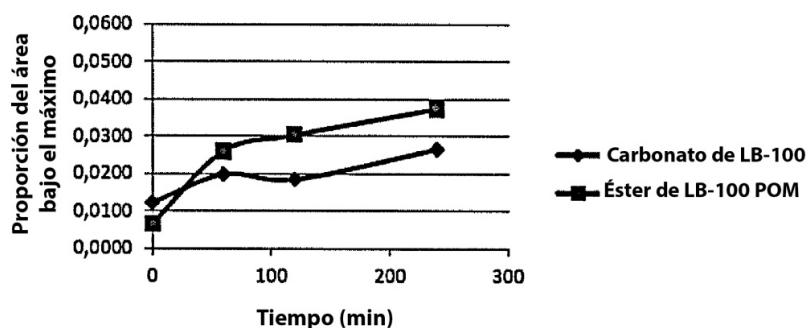


Fig. 8A-8B

C.

Formación de Endothal en sangre entera de mono



D.

Formación de Endothal en sangre entera de rata

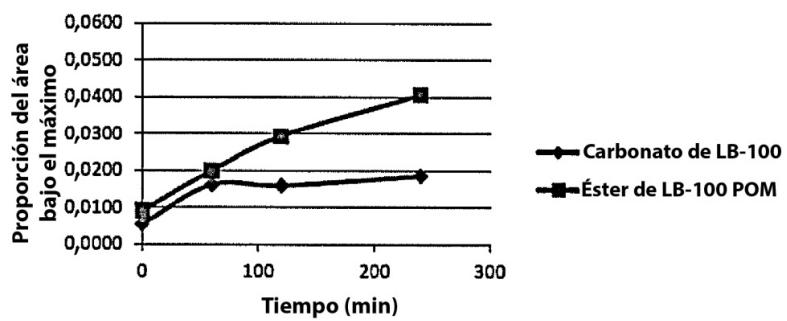
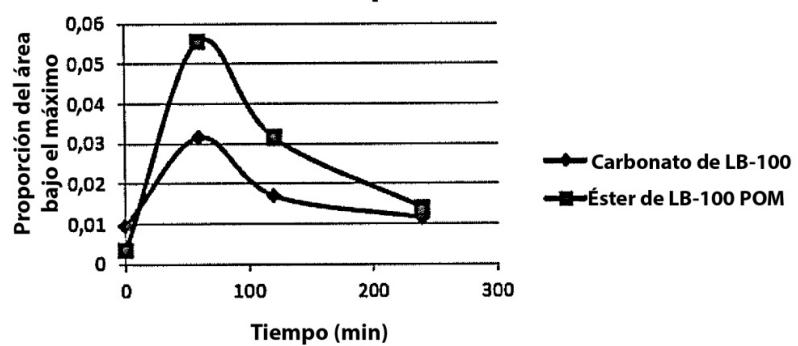


Fig. 8C-8D

E.

**Formación de LB-100 en sangre
entera de perro**



F.

**Formación de LB-100 en sangre
entera de ser humano**

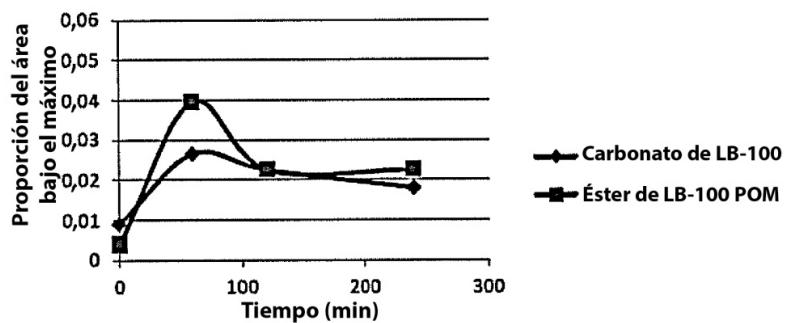
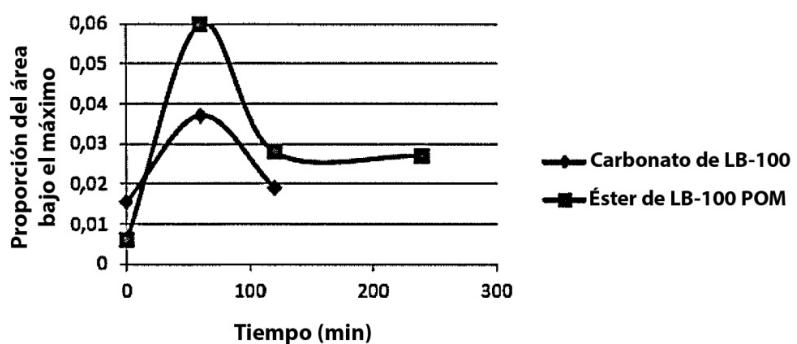


Fig. 8E-8F

G.

Formación de LB-100 en sangre entera de mono



H.

Formación de LB-100 en sangre entera de rata

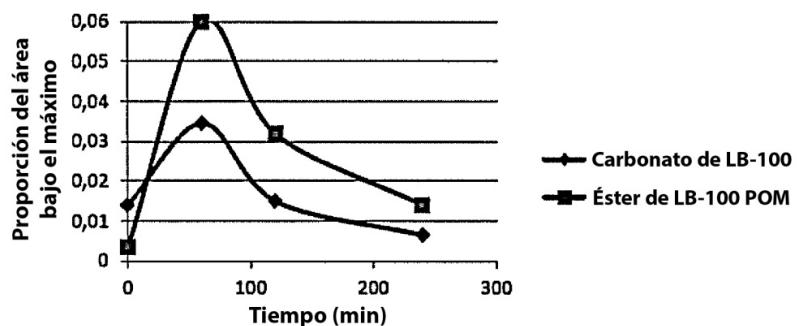


Fig. 8G-8H

ES 2 795 950 T3

Artículo de prueba	Conc. de prueba	Duración del ensayo	P_{ap} media de A→B ($10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$)	P_{ap} media de B→A ($10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$)	Propor-ción de salida	Comentario
ranitidina	10 μM	2 h	0,054	1,8	32,6	control de baja permeabilidad
warfarina	10 μM	2 h	15,1	30,9	2,0	control de alta permeabilidad
talinolol	10 μM	2 h	0,021	2,9	139	control de salida de P-gp
LB-151	10 μM	2 h	0,18	8,8	48,7	
Éster de LB-100 POM	10 μM	2 h	0,19	28,5	152	
Carbonato de LB-100	10 μM	2 h	0,12	11,2	95,1	

P_{ap} : coeficiente de permeabilidad aparente

Proporción de salida: $P_{ap}(B \rightarrow A) / P_{ap}(A \rightarrow B)$

Fig. 9